



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁵ : C12N 15/80, 15/67, C12P 21/02	A1	(11) International Publication Number: WO 94/08024 (43) International Publication Date: 14 April 1994 (14.04.94)
<p>(21) International Application Number: PCT/FI93/00402</p> <p>(22) International Filing Date: 6 October 1993 (06.10.93)</p> <p>(30) Priority data: 924494 6 October 1992 (06.10.92) FI</p> <p>(71) Applicant (for all designated States except US): VALTION TEKNIILLINEN TUTKIMUSKESKUS [FI/FI]; Vuorimiehentie 5, FIN-02150 Espoo (FI).</p> <p>(72) Inventors; and</p> <p>(75) Inventors/Applicants (for US only) : KERÄNEN, Sirkka [FI/FI]; Rahakamarinkatu 4 B 12, FIN-00240 Helsinki (FI). AALTO, Markku [FI/FI]; Pellonperäntie 4, FIN-00380 Helsinki (FI). OUTOLA, Mika [FI/FI]; Hatuntekijänkuja 3-5 B 55, FIN-00750 Helsinki (FI). RONNE, Hans [SE/SE]; Dirigentvägen 169, S-756 45 Uppsala (SE). PENTTILÄ, Merja [FI/FI]; Vähäntuvantie 9 A 6, FIN-00390 Helsinki (FI).</p>		<p>(74) Agent: OY JALO ANT-WUORINEN AB; Iso Rooberinkatu 4-6 A, FIN-00120 Helsinki (FI).</p> <p>(81) Designated States: AU, CA, FI, JP, NO, NZ, US, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Published With international search report.</p>
<p>(54) Title: INCREASED PRODUCTION OF SECRETED PROTEINS BY RECOMBINANT EUKARYOTIC CELLS</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to recombinant DNA technology. Specifically this invention relates to new recombinant eukaryotic cells transformed with SSO genes. Eukaryotic cells transformed with several copies of SSO genes, or overexpressing the Sso protein by some other means, have an increased capacity to produce secreted foreign or endogenous proteins. Further, the said new recombinant cells, when transformed with genes expressing suitable hydrolytic enzymes can utilize appropriate macromolecular compounds more efficiently, which results in increased cell mass production and/or more versatile utilization of the compounds in relevant biotechnical applications.</p> <p style="text-align: right;">BEST AVAILABLE COPY</p>		

* NOTICES *

IPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

Claim(s)]

1. DNA array from which sec1 suppressor-gene SSO which will enable increase of amount of protein production of this cell if superfluous manifestation is carried out in eukaryotic cell was isolated, or its homologous array.
2. DNA array according to claim 1 which this DNA array is the fungus origin, and will enable increase of this host's amount of protein production if superfluous manifestation is carried out in fungus host.
3. SSO1 array which carries out code of polypeptide which consists of amino acid sequence essentially expressed with array numbers 2 and 4, respectively and SSO2 array, DNA array according to claim 2 chosen as list from those functional fragments.
4. Vector including DNA array according to claim 1 to 3.
5. When the transformation of the eukaryotic cell is carried out by it, it is the vector according to claim 4 in which the autonomous replication is possible.
6. When the transformation of the eukaryotic cell is carried out by it, it is the vector according to claim 4 in which the nest to this the cell chromosome is possible.
7. Vector according to claim 4 which this vector is yeast expression vector and is characterized by discovering this DNA array under control of yeast gene control region.
8. Vector according to claim 7 characterized by being chosen out of group to which this yeast gene control region becomes each promoterregion of SSO1 gene, SSO2 gene, SEC1 gene, GAL1 - GAL10 gene, alcohol dehydrogenase gene ADH 1, and asparagine synthetase gene, and list from functional part of those promoterregions.
9. Vector according to claim 4 which this vector is mold expression vector and is characterized by discovering this DNA array under control of control region which functions within Hyphomycetes.
10. The vector according to claim 9 characterized by being chosen out of the group which the control region which functions within above-mentioned Hyphomycetes becomes from each promoterregion of the gene of sso, cbh1, cbh2, egl1, egl2, tef1, pgk, pki, glucoamylase, alpha-amylase, and alcohol dehydrogenase.
11. The vector according to claim 4 with which this vector is a fungus vector chosen from the group which consists of YEpSSO1 and YEpSSO2, and the structure is indicated to be to drawing 1.
12. The recombination eukaryotic cell which supports a DNA array according to claim 1 to 3, and discovers Sso protein with a high level.
13. The recombination eukaryotic cell according to claim 12 which is a fungus cell belonging to the kind chosen from the group which consists of a Saccharomyces (Saccharomyces) group, a Trichoderma (Trichoderma) group, the Clive ROMISESU (Kluyveromyces) group, Schizosaccharomyces POMBE (Schizosaccharomyces pombe), the Pichia (Pichia) group, the Hansenula (Hansenula) group, the Yarrowia (Yarrowia) group, an Aspergillus (Aspergillus) group, and a Neurospora (Neurospora) group.
14. Saccharomyces (Saccharomyces) Group and Trichoderma (Trichoderma)
The recombination eukaryotic cell according to claim 13 which is a fungus cell belonging to the kind chosen from a group.
15. The recombination eukaryotic cell according to claim 14 which is -92072 shares (trust number: DSM7253) of Saccharomyces cerevisiae (Saccharomycescerevisiae) VTT-C.
16. The recombination eukaryotic cell according to claim 14 which is -92073 shares (trust number: DSM7254) of Saccharomyces cerevisiae (Saccharomycescerevisiae) VTT-C.
17. Sso protein -- the construction approach of the eukaryotic cell which can be discovered with a high level -- carrying out -- the DNA array which carries out the code of the Sso protein from (a) donor living thing -- isolating

- the vector which supports at least one of the (b) this DNA arrays — building — and — The approach of including what is done for the transformation of the host cell by at least one of the vectors (c) Obtained.
8. The approach according to claim 17 characterized by being chosen from the group which this host becomes from a *Saccharomyces* (*Saccharomyces*) group, a *Trichoderma* (*Trichoderma*) group, the *Clive ROMISESU* (*Kluyveromyces*) group, *Schizosaccharomyces POMBE* (*Schizosaccharomyces pombe*), a *BIHIA* (*Pichia*) group, the *Hansenula* (*Hansenula*) group, the *Yarrowia* (*Yarrowia*) group, an *Aspergillus* (*Aspergillus*) group, and the *Neurospora* (*Neurospora*) group.
9. The approach according to claim 18 characterized by this host belonging to the kind chosen from a *Saccharomyces* (*Saccharomyces*) group and a *Trichoderma* (*Trichoderma*) group.
10. Make it Approach of Increasing the Amount of Protein Production of Foreignness or Internality by Carrying Out Superfluous Manifestation of the SSO Gene. (a) The DNA array which carries out the code of the protein of foreignness or internality is isolated from a donor living thing. (b) The vector which supports at least one of these the DNA arrays is built. (c) — or [carrying out the transformation of the host who discovers Sso protein with a high level, rearranging him by the obtained vector, and obtaining a host cell] — or Carry out the transformation of the host by this vector, and the transformation of this transformant is again carried out to an SSO gene or an SSO gene with a homologous gene. How to screen the cell to which the production ability of the above-mentioned protein was raised, and include cultivating (d) this recombination host cell under the conditions which can discover the above-mentioned protein.
11. Make it Approach of Increasing the Amount of Production of Protein of Foreignness or Internality by Carrying Out Superfluous Manifestation of SSO Gene and the Gene (for example, SEC1) Which Interacts under Existence of Sso Protein of Normal Amount or Increased Amount. (a) The DNA array which carries out the code of the protein of foreignness or internality is isolated from a donor living thing. (b) The vector which supports at least one of these the DNA arrays is built. (c) — or [carrying out the transformation of the host who does the superfluous manifestation of the gene (for example, SEC1) of others which discover Sso protein with normal level or a high level, and interact with an SSO gene by the obtained vector, rearranging him, and obtaining a host cell] — or The transformation of the host is carried out by this vector. This transformant An SSO gene or a gene [homologous / gene / SSO], And a transformation is again carried out with an SSO gene and the gene (for example, SEC1) which interacts. the cell to which the production ability of the above-mentioned protein was raised — screening — and — The approach of including what the recombination host cell (d) Obtained is cultivated for under the conditions which can discover the above-mentioned protein.
12. Make it Approach of Increasing Production of Internality Protein. (a) Are gene independent [homologous / gene / an SSO gene or / SSO], or the transformation of the cell which produces internality protein is carried out in collaboration with an SSO gene and the gene (for example, SEC1) which interacts. (b) — the transformant which produces this internality protein with a high level was screened, and protein production ability was raised — rearranging — a cell — obtaining — and — The approach of including what (c) this recombination cell is cultivated for under the conditions which can discover this internality protein.
13. Make it the Approach of Producing Biomass Efficiently Using Raw Material, or Hydrolyzing Raw Material Efficiently. (a) The DNA array which carries out the code of the hydrolase of internality or foreignness is isolated from a donor living thing. (b) The fungus vector which supports at least one of these the DNA arrays is built. (c) — or [carrying out the transformation of the fungus host who discovers Sso protein with a high level, rearranging him by the obtained vector, and obtaining a host cell] — or Carry out the transformation of the host by this vector, and the transformation of this transformant is carried out to an SSO gene or an SSO gene with a homologous gene. How to include what the cell to which the production ability of the above-mentioned hydrolase was raised is screened, and the recombination host cell (d) Obtained is cultivated for under the conditions which can discover the above-mentioned hydrolase.
14. Make it the Approach of Producing Biomass Efficiently Using Raw Material, or Hydrolyzing Raw Material Efficiently by Carrying Out Superfluous Manifestation of SSO Gene and the Gene (for example, SEC1) Which Interacts under Existence of Sso Protein of Normal Amount or Increased Amount. (a) The DNA array which carries out the code of the hydrolase of internality or foreignness is isolated from a donor living thing. (b) The vector which supports at least one of these the DNA arrays is built. (c) — or [carrying out the transformation of the host who discovers Sso protein and the protein which interacts with a high level, rearranging him under existence of the Sso protein of a normal amount or the increased amount, by the obtained vector, and obtaining a host cell] — or The transformation of the host is carried out by this vector. This transformant An SSO gene or a gene [homologous / gene / SSO], And carry out a transformation again with an SSO gene and the gene (for example,
- http://www4.ipdl.ncipi.go.jp/cgi-bin/tran_web.cgi_eje?u=http%3A%2F%2Fwww4.ipdl.ncipi.go.jp%2FTokuji... 8/22/2006

IP,08-501695,A [CLAIMS]

SEC1) which interacts, and the cell to which the production ability of the above-mentioned hydrolase was raised is screened. (d) How to include what the recombination host cell obtained is cultivated for under the conditions which can discover the above-mentioned hydrolase.

Translation done.]

* NOTICES *

IPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

Production technical field to which the protein by the recombination eukaryotic cell increased This invention relates to recombinant DNA technology. Especially this invention relates to the new recombination eukaryotic cell by which the transformation was carried out by the SSO gene or its homologue. The protein production ability of the eukaryotic cell by which the transformation was carried out to the SSO gene or SSO gene of a number copy with the homologous gene of foreignness or internality improves.

Furthermore, if the transformation of an above-mentioned new recombination eukaryotic cell, especially yeast, or hyphomycetes is carried out with the gene which discovers suitable hydrolase, they can hydrolyze and/or use more efficiently suitable macro molecular / polymerization compound. Therefore, in a suitable bionics-application, the extensive production and/or the various use by the cell of this macro molecular / polymerization compound are attained.

Background technique By development of a recombinant DNA method, production of the protein in a different-species host system was attained. Important protein or the difficult protein of isolation and purification usually came to be obtained very easily by this at a nature on the therapy which does not recognize little deer existence extremely, for example. Activity protein or peptide is mentioned biologically [a growth factor, hormone, and others that have been conventionally isolated from body fluid, such as tissue of Homo sapiens or an animal or a blood serum, and urine,] as an example of such protein. Since existence of the pathogen of the tissue of a Homo sapiens virulence virus like HBV, HIV, and a carcinogenic virus, Homo sapiens, or an animal or others in body fluid is still more dangerous, retrieval of the proteinic different-species production system which uses these viruses for the therapy of the illness from which a pathogen becomes a cause is hurried very much. Especially as protein of important others, there is protein of the microorganism of a virus required for manufacture of the diagnostic vaccine of the illness produced more to the microorganism which is hard to grow, and the microorganism which is a dangerous Homo sapiens pathogen, and others, or an anthropophilic insect on clinical by the Inn vitro or tissue culture. As an example of these microorganisms, anthropophilic insects, such as viruses, such as HBV, HIV, a yellow fever virus, a rubella virus, a foot-and-mouth disease virus, and a rabies virus, and malaria, etc. are mentioned.

The different-species production system is developed or a secretion enzyme, especially the secretion enzyme which hydrolyzes the vegetable matter are mentioned as other one protein group currently developed. These are required also in other industrial processes, such as not only manufacture of food and digestible protein but textile industry, pulp, paper-making business, etc. If protein production by the different-species system or production of the internality protein in the cell operated hereditarily is attained, the yield will improve and purity will also become remarkably high. Moreover, this technique has already had big effect on the structure of the protein of many of important enzymes and others, or research of a function by today. For example, when production and secretion of foreignness hydrolase were attained in yeast, the process using industrial yeast stocks, such as distillation yeast, brewer's yeast, or baker's yeast, is improved.

Various production systems are developed, for example, multicellular organisms, such as transgenic ** and vegetation, are mentioned to bacteria, yeast, Hyphomycetes, ** and a vegetable cell culture object, and a pan. Even if all of these systems have a fault, they have each advantage, therefore they are required.

Saccharomyces cerevisiae (Saccharomyces cerevisiae) which is yeast is eukaryote now best known for gene level. This microorganism has that most as an eukaryon nature microorganism even if it is not all of the advantages which an eukaryotic cell has, for example, the qualification which takes place after the translation of eukaryote, and, on the other hand, has as a microorganism the ease of dealing with it and culture property which bacteria

ave."S. SEREBISHIE is a microorganism made useful for a long time in biotechnology, such as manufacture of drinks, such as a food constituent, and Biel, wine, and the large-scale fermentation system using this microorganism is also fully developed.

The genetic manipulation approach of yeast is progressing most also in eukaryote based on the huge knowledge acquired according to classical genetics. Therefore, only about *Escherichia coli* (*Escherichia coli*), the technique of the gene engineering which was not discussed can apply easily also in yeast, and, moreover, it can develop now further in the beginning. Moreover, according to the option, the method of building the yeast-fungus stock which produces foreignness protein is developed widely (Romanos et).

al., 1992.

In order to make a culture culture medium secrete protein, this protein is carried via various film closed system partitions which constitute the secretory pathway. First, protein moves to the lumen of an endoplasmic reticulum (ER). From there, this protein is carried by the membrane vesicle, moves to a Golgi complex, and moves to plasmalemma from a Golgi complex further. This secretion process consists of some processes, and the vesicle containing protein buds from a donor's film, and unites the film of an acceptor as a target. In each of these processes, an operation of the protein with which some differ is needed.

Many genes are clarified very much by isolating the conditional-lethal-mutation stock which has a defect in the process of specification with the secretion process which participates in the secretory pathway of yeast, and it (Novick et al., 1980; 1981). By the mutation of the protein needed for a certain specific conveyance process, the secreted protein is accumulated in the film partition before the process. Thus, protein can be accumulated in the vesicle between ER, a Golgi complex, and ER and a Golgi complex, or the vesicle between a Golgi complex and plasmalemma.

The gene and protein which participate in a secretion process can be further analyzed now in a detail by characterization of cloning of this gene and the function of the protein corresponding to it. In all processes, it became clear that some protein which interacts is functioning. In recent years, we spoil growth and proteinic secretion in an elevated temperature. sec 1-1 As a multi-copy suppressor, cloning of the SSO1 and SSO2 which are two new yeast genes was carried out (Aalto et al., 1993).

S. About SEREBISHIE, much identification and many isolated genes are discovered and cloning is carried out from other living things based on sequence homology [with a yeast gene], or the complementarity of yeast mutation. The NSF factor of mammalian is the homologue of the SEC18 gene production object of yeast, and the same function is shown in protein secretion (Wilson et al., 1989).

Moreover, cloning of the SEC14 gene (Lopez et al., 1992) of *Yarrowia lipolytica* (*Yarrowialipolytica*) was carried out, and it has characterized. Cloning of the homologue of mammalian to yeast SEC11 gene which carries out the code of the component of a signal peptidase is carried out (Greenberg et al., 1989). Cloning of the *Schizosaccharomyces POMBE* (*Schizosaccharomyces pombe*) YPT1 gene which carries out the code of the small GTP-binding protein was carried out, using yeast SEC4 gene as a probe (Fawell et al., 1989), and it was proved that the gene of the mammalian corresponding to this YPT1 gene is a part of secretion mechanism using the antibody to yeast Ypt1 protein (Segev et al., 1988). The mammalian rab1 protein (Zaraoui et al., 1989) with which it was proved by Ypt1 protein that it is homologous plays the same role as the function of yeast Ypt1 protein (Haubruck et al., 1990). It sets on yeast SSO1 gene and SSO2 gene by this invention, and protein level, and a homologous gene is a mouse (Hirai et al., 1992), a rat (Inoue et al., 1992; Bennett et al., 1992), and a nematode (Ainscough et al., 1991:).

EMBL Data Bank 29, trust number:M It turns out that it is discovered by some specieses, such as 75825, therefore these genes are held in the process of evolution. Also in other kinds, cell surface ***** of such homologous protein is carried out, or it is thought that it is participating in the synaptic vesicle transportation to cell surface, and relating to SSO1 gene and SSO2 gene, and a functional target is suggested. However, participating in secretion directly is only proved only about Sso protein, and, moreover, we report it (Aalto et al., 1993). The homologues to the synaptic vesicle membrane protein which yeast has, i.e., SHINAPUTO brevins, (synaptobrevins) are Snc1 and Snc2 protein (Gerst et al., 1992-rotopopov et al., 1993).

The above-mentioned example (further many examples are also reported) shows the universality of secretion mechanism. Therefore, the result obtained about yeast is almost applied also to other eukaryotic cells at other true fungi and a pan.

The gene which has an array similar to an SSO gene is participating in other processes other than the above of transportation/secretion of intracellular protein. For example, in SED5 gene (Hardwick and Pelham, 1992), PEP12 gene (Becherer and Jones, 1992) is participating in transportation/secretion of the protein between a Golgi

complex and a vacuole (lysosome partition of yeast) between ER and a Golgi complex. As for this, in proteinic secretion and intracellular transport, central and having the held role are further supported for an SSO gene. However, when the superfluous manifestation of the SSO gene homologue is carried out in yeast or an animal cell, there is no report about what the advantageous effectiveness that we show an SSO gene by this invention is produced for about proteinic secretion.

It is seldom known about the secretion system of yeast other than the above of *Clivia ROMISESU* (*Kluyveromyces*), *Pichia* (*Pichia*), *Schizosaccharomyces* (*Schizosaccharomyces*), *Hansenula* (*Hansenula*), etc. However, such yeast is understood are useful as a host of foreignness protein production (Buckholz and Gleeson, 1991). Although such yeast is not solved like *Saccharomyces* genetically and in molecular biology, they are useful as *Saccharomyces* and an EQC as a production host. This is being able to say also about *Hyphomycetes*, such as the *Neurospora* (*Neurospora*) group conventionally used for production of foreignness protein, an *Aspergillus* (*Aspergillus*) group, and a *Trichoderma* (*Trichoderma*) group, (Jeenes et al., 1991). Since very many *Hyphomycetes* belongs to taxonomy top true fungi and belongs to ascomycotina further like *S. SEREBISHIE*, it is clear that its secretion mechanism is similar with *S. SEREBISHIE*.

Hyphomycetes secretes self hydrolase very efficiently. However, production of the foreignness protein in *Hyphomycetes* is not so efficient. In many cases, this is considered because secretion is inadequate. The description common to all funguses is posttranslational modification which happens along with a secretory pathway.

In order to raise production of yeast, *Hyphomycetes*, and foreignness [in / further / other living things] protein, some attempts have so far been made and announced. Moreover, many efforts have been spent on construction of the various promoters and the plasmid for making imprint level high or making the copy number of a plasmid increase (see Baldari et al., 1987; Martegani et al., 1992; Irani and Kilgore, and 1988). The general approach for increasing secretion is using the signal sequence of yeast (Baldari, et al., 1987; Vanoni et al., 1989). In yeast and *Hyphomycetes*, in order to make foreignness protein secrete still more efficiently Screening of the random mutagenesis of protein, and a mutant () [Smith et al., 1985; Sakai et al., 1988; Schuster et al.,] [1989; Suzuki et al., 1989; Sleep et al., 1991; Lamsa and Bloebaum, 1990; Dunn-Coleman et al., 1991, Or fusion in the internality protein with which foreignness protein was secreted efficiently (Ward et al., 1990; Harkki et al.) 1989; Nyyssönen et al., 1993; Nyyssönen et al., 特許出

** is used widely. However, there is a limitation in these approaches. Since it is a recessive trait chiefly, the overprotein production mutant isolated by giving and screening random mutagenesis is not used as an industrial yeast stock which is polyplont. This superfluous production is caused by change other than increase of secretion, and, in many cases, often affects only the protein used for screening. On the other hand, in the approach by fusion protein, it is required to adjust the fused structure of each foreignness protein, respectively.

In our approach, the copy number of the gene which functions in secretion is made to increase, and the amount of the constituent of secretion mechanism will become more nearly universal. Therefore, if it is protein without special fused structure, it can apply, and it can apply also to the stock of diplont or polyplont.

In a secretion process, although not correctly known about which process serving as a bottleneck, it can expect that such a process is plurality. We began to solve the failure which may be encountered in the culmination of a secretory pathway. And the vesicle which comes into bud from a Golgi complex made plasmalemma the target, and characterized by carrying out cloning of the gene which participates in the culmination of the secretion process which is the phase which unites with it and emits protein out of a cell. We characterized by carrying out cloning of the SEC1 gene which functions in this phase previously (Aalto et al., 1991;).

Aalto et al., 1992. Then, it was shown that this SEC1 gene is an indispensable single copy gene (Aalto et al., 1993). Moreover, cloning of the SSO gene by this invention was carried out as a multi-copy suppressor of one to sec1 mutation (Aalto et al., 1993).

Outline of invention If the superfluous manifestation of this invention is carried out, it will indicate isolation of the gene in which production of protein increases. Especially this invention indicates the superfluous manifestation in there in isolation of SSO1 gene of *S. SEREBISHIE* which carries out the code of Sso1 protein and the Sso2 protein, respectively, and SSO2 gene, characterization of this gene, and the introductory list to *S. SEREBISHIE* of this gene. Furthermore, this invention indicates the superfluous manifestation in the installation and there to characterization and *Trichoderma* of isolation of the SSO homologous gene from *Trichoderma RESEI* (*Trichoderma reesei*), and this gene.

Furthermore, it is shown by sequence homology [of the SSO gene cluster of yeast, and the gene cluster to which Tomomasa Taka nucleus cell corresponds] that this invention can be used for the construction of the new cell strain of higher eukaryote which has the raised secretion ability.

Therefore, this invention offers the yeast stock which discovers a new recombination eukaryotic cell, the fungus host cell which discovers Sso protein with a high level preferably especially Sso1 protein, and/or Sso2 protein with a high level, and the Trichoderma stock which discovers Trichoderma Sso protein with a high level. Moreover, this invention offers the approach of increasing production of protein by carrying out the superfluous manifestation of an SSO gene and the gene which interacts like SEC1 gene.

Protein production ability of the eukaryotic cell in which a transformation is carried out by the SSO gene or SSO gene by this invention, and the gene which interacts improves. Moreover, the new eukaryotic cell by this invention especially yeast, and Hyphomycetes are used for hydrolysis of production of still more efficient hydrolase, the polymerization nature matter, etc. If such a fungus is used, the other processes that efficient production of the single cell by the increment in cell mass, a bionics-process like beer yeast production, or hydrolase and/or efficient hydrolysis of a vegetable ingredient are made useful will be improved.

Easy explanation of a drawing Drawing 1 shows the plasmids YEpSSO1 and YEpSSO2 which include cDNA of S. SEREBISHIE SSO1 gene and SSO2 gene in the multi-copy plasmid pMAC561, respectively, and are obtained.

Drawing 2 shows the Western blot analysis proving the superfluous manifestation of the Sso2 protein in the yeast in which the transformation was carried out by YEpSSO2.

Drawing 3 is a graph which shows increase of the amount of bacillus alpha-amylase production secreted by S. SEREBISHIE (sf750-14D stock) which carried out the transformation by the multi-copy plasmid which discovers SSO1 gene or SSO2 gene, and another plasmid which discovers a bacillus (Bacillus) alpha-amylase gene.

Drawing 4 shows the Western analysis of the bacillus alpha-amylase secreted by S. SEREBISHIE which does not have or have the multi-copy plasmid which discovers SSO1 gene or SSO2 gene.

Drawing 5 is a graph which shows increase of the amount of bacillus alpha-amylase production secreted by S. SEREBISHIE (746 shares of DBY(s)) which carried out the transformation by the multi-copy plasmid which discovers SSO2 gene, and another plasmid which discovers bacillus alpha-amylase.

Drawing 6 is a graph which shows increase of the amount of bacillus alpha-amylase production secreted by S. SEREBISHIE (746 shares of DBY(s)) which carried out the transformation by the multi-copy plasmid which discovers SEC1 gene, and another plasmid which discovers bacillus alpha-amylase.

Drawing 7 shows the plasmid pRbSSO2 which builds into BS+ vector the SSO2 manifestation cassette sandwiched by the ribosome array from both sides, and is obtained.

Drawing 8 shows HAIBUDAIZESHON of DNA originating in six kinds of different fungus kinds, and yeast SSO1 gene.

Detailed description The specific vocabulary used below is defined so that detailed explanation of the following this inventions may be understood better.

Superfluous manifestation of a gene: The amount of production in intracellular [of the protein in which a code is carried out by said gene] increases. This puts this gene of many copy numbers on a plasmid, and introduces it into a cell, or is included in a genome, and can be attained by making the copy number of this gene increase.

Moreover, a superfluous manifestation can attain this gene also by arranging under control of a promotor more powerful than the promotor of itself. The amount of this protein in a cell can be adjusted by changing variously a promotor's reinforcement used for the copy number of a gene, and/or a manifestation.

Oppression of mutation: A fall or when it is spoiled completely, this 2nd gene is called the suppressor of the 1st gene by the mutation of the gene (the 2nd gene) of others [effectiveness / of the mutation of a certain specific gene (the 1st gene)]. Oppression (suppression) may take place also by the superfluous manifestation of the wild type allele of the 2nd gene by the above-mentioned approach. This is called superfluous manifestation oppression. When a superfluous manifestation is caused by the suppressor gene of many copy numbers, it is also called multi-copy oppression. Generating of suppression shows that these two genes are interacting on gene level. This interaction happens also on physical level as direct and physical contact between two protein in which these two genes carry out a code.

A homologous gene, homologue: The gene which has the same function identically although there is relation in a DNA array is called as it is homologous mutually and a homologue mutually.

Protein: A secretory pathway is in the interior of a cell, and calls protein the protein conveyed to extracellular (outside of plasmlemma) through the path. or it has combined this protein with the cell wall like an invertase in

yeast — or foreignness protein bacillus alpha-amylase — like — a cell wall — leading — a growth culture medium — Hanaten — last **

SSO1 gene and SSO2 gene which are used by this invention are isolated from the living thing containing these genes, for example, *Saccharomyces cerevisiae*, (*Saccharomyces cerevisiae*), and a *Trichoderma* (*Trichoderma*) group. Moreover, they are *Schizosaccharomyces POMBE* (*Schizosaccharomyces pombe*) and *Clive ROMISESU RAKUTISU* (*Kluyveromyces lactis*) as true fungi of the other suitable yeast and others.

The *Pichia* (*Pichia*) group, the *Hansenula* (*Hansenula*) group, an *Aspergillus* (*Aspergillus*) group, the *Neurospora* (*Neurospora*) group, a *penicillium* (*Penicillium*) group, etc. are mentioned. It should also note also being able to use the homologous gene isolated from other living things.

Furthermore, in this process, secretion can be raised by carrying out the superfluous manifestation of the other genes which function in collaboration with an SSO gene under existence of the Sso protein of normal level or the increased level like SEC1 gene. The gene which functions at the process in front of a secretion process is also considered to have the same effectiveness probably. Therefore, isolation of the vesicle from the Golgi partition searches for making the copy number of SEC7 gene with which functioning at this isolation process is known, and/or SEC14 gene increase (Novick et al., 1980) or SEC7 gene and/or SEC14 gene, and the gene (for example, suppressor of such mutation) that interacts, and is promoted by making that copy number increase. Similarly any fast process of a secretion process can be improved by making the copy number of a gene which involves increase. As for the overlapping gene playing an important role by intracellular is suggested saying, SSO1 and SSO2 which are the new gene which we isolated from *S. SEREBISHIE* are typical. as described above, the properties and those homology of SSO1 gene and SSO2 gene are held in other kinds — being based — us — all — others — if an SSO gene is made to increase in an eukaryote kind, it will propose that the protein secretion effectiveness in other yeast, *Hyphomycetes*, animals-and-plants cells, etc. increases.

Please observe this invention including the manifestation in the yeast gene expression in *Hyphomycetes* and the *Tomomasa Taka* nucleus living thing for promoting secretion and its reverse (namely, mold within yeast and gene expression of a *Tomomasa Taka* nucleus living thing), or another eukaryote of the gene of eukaryote according to the fact that many genes were participating in the secretion in other living things.

As a host as for whom a transformation is done by the gene of this invention As long as it is a suitable eukaryotic cell for production of foreignness or internality protein; you may be what kind of thing. for example, *S. SEREBISHIE* yeast stock (DBY746, AH22, and S150-2B —) GPY55-15Balpha, VTT-A-631015 grade, *T. hull JIANAMU* (*T.harzianum*) and *T. RESEI* (*T.ressei*) originating in QM6a (RUTC-30, QM9416, VTT-D-79125 grade) which is a *Trichoderma* [natural isolation object

Stock], the *Clive ROMISESU* group, *Sch. POMBE*, *H. poly MORUFA* (*H.polymorpha*), the *Pichia* group, an *Aspergillus*, the *Neurospora* group, the *Yarrowia* group, a *Penicillium*, or a still higher eukaryotic cell is mentioned. The import to these hosts of this gene can be attained using the conventional approach that these living things are indicated, for example.

The DNA array containing SSO1 gene or SSO2 gene is isolated from *S. SEREBISHIE* by the conventional approach. In one desirable mode, the gene or cDNA library on a multi-copy plasmid is used for oppression of the mutation to which deletion of oppression (Aalto et al., 1991; 1993) of the temperature sensitivity of one to sec1 mutant or the function of an *S. SEREBISHIE* SSO gene is carried out, or the analog mutation of other kinds. As another approach, the known DNA array of a gene similar to an SSO gene and an SSO gene is used for the design of the probe used for different-species hybridization, or the PCR primer used for cloning of an SSO gene. The antibody to a gene similar to a known SSO gene and a known SSO gene as another approach furthermore is used for cloning of this gene by the conventional method.

S. The one approach of indicating below crawls on the gene equivalent to SSO1 gene of *SEREBISHIE*, and SSO2 gene again, and it is used for it whether they are shoes, and it is isolated also from the other true fungi or a *Tomomasa Taka* nucleus living thing. The approach is changeable according to the eukaryotic cell of this ** according to conventional knowledge and a conventional means, although especially the isolation from *Trichoderma RESEI* which is mold here is indicated.

T. Leh Ceh's cDNA bank is built by the yeast vector pFL60 as indicated by the Finland country patent application No. (Buchert et al.) 2373 [92 to] specification. This gene bank DNA is screened by the complementarity of a secretion deficit which is inserted in *S. SEREBISHIE* H458 share, and carries out the transformation of this stock (Aalto et al., 1993), for example, is indicated by the example 6. isolation — This plasmid is isolated from an electropositive colony and this gene is characterized with a conventional method. And this considerable

chromosomal gene is isolated. Sufficient complementarity shows that a yeast SSO gene and the same gene as a functional target exist, other true fungi, for example, T. RESEI.
 Or the gene which carries out the code of the protein corresponding to the Sso1 protein and/or Sso2 protein of S. SEREBISHIE can be isolated from cDNA prepared from T. Leh Ceh by the different-species hybridization under conditions which are indicated by the example 7, and which are not comparatively severe, or a chromosome gene bank, and can be characterized by the usual approach. The function of this gene can also be investigated by approach which was described above. It has a chromosome arrangement [homologous / gene / yeast SSO]. (for example, analyzed by the Southern blotting hybridization of the whole DNA) Also about all the living things currently proved, the same approach is used suitably. Moreover, this gene can also be isolated from a manifestation library using the antibody prepared to yeast Sso protein.

On the other hand, an oligonucleotide primer can be designed based on the homology discovered between the each genes isolated from several sorts of living things. Clear homology is accepted in the amino acid field of - of No. 266 No. 287 of for example, Sso1 protein (array number 1), and the amino acid field of - of No. 269 No. 290 of Sso2 protein (array number 3). These primers are used for the magnification in PCR of T. RESEI gene.

In order to build the suitable plasmid for the transformation of yeast, cloning is carried out to the vector (Ruohonen et al., 1991; Ruohonen et al., manuscript in preparation, a) guided in SSO1 gene or SSO2 gene from the yeast expression vector containing the control region of a suitable yeast expression vector [for example, pAAH5 (Ammerer, 1983)] etc. or suitable yeast. These control regions can be obtained from ADH1, GAL1-GAL10, PGK1, SUP1, GAP and CYC1, the yeast gene of PHO5 grade, or an asparagine synthetase gene. Moreover, the control region of SSO1 gene or SSO2 gene is also used for a manifestation within S. SEREBISHIE of this gene.

After light conversion of the yeast stock which is a recipient strain is carried out by the plasmid which is supporting SSO1 gene or SSO2 gene, it can replicate autonomously (The plasmid carrying the SSO1 or SSO2 gene is capable of replicating autonomously when transformed into the recipient yeast strain). SSO1 gene or SSO2 gene is flanked in a suitable yeast control region. Cloning is carried out to single copy yeast vectors, such as pHR70, or pRS313, pRS314, pRS315, pRS316 (Sikorski and Hieter, 1989).

Moreover, it is also possible to include SSO1 gene of many copy numbers or SSO2 gene in a yeast chromosome, for example, a ribosomal RNA seat. In order to start this nest, the ribosome array of a suitable plasmid [for example, the plasmid pIRL9 (Hallborn et al., patent application)] etc. is separated, and as shown in drawing 7, cloning is carried out suitably for BS+ vector. It dissociates from the hybrid vector containing this gene, and cloning of SSO1 gene or SSO2 gene connected between the suitable yeast promoter and the terminator field is carried out to the plasmid obtained at the front process. In this way, the manifestation cassette inserted from both sides in the ribosome array is separated from the obtained plasmid. With the autonomous replication plasmid which is supporting the suitable marker for a transformation, this fragment is built into yeast and carries out the transformation of this yeast. This plasmid is removable from the cell containing SSO1 gene of many copy numbers or SSO2 gene included in the chromosome after light conversion by cultivating this cell under a non-condition per se. Thus, the recombination strain which is not supporting excessive foreign DNA, such as a bacteria vector array, at all is obtained. When polyplont yeast stocks (for example, VTT-A -63015 etc.) are used, this gene can be included also in an indispensable locus like ADH1 seat or PGK1 seat.

In order to make an SSO gene discover within Trichoderma, it includes in the strain which produces the Trichoderma stock which connects the coding region of a Trichoderma sso gene between for example, T. RESEI cbh1 promoter and a terminator, and produces for example, a mammalian antibody and other foreignness protein for the obtained manifestation cassette or an EGI core, another cellulase, or hydrolase, and the transformation of this is carried out. Promotion of secretion is wished especially when that bacillus's is grown on a glucose content culture medium, and, for that, a sso gene must be discovered from the promoter who functions on a configuration promoter or a glucose culture medium.

In Hyphomycetes, a sso gene is included in a genome using the approach that it is desirable and well-known at this technical field. As suitable promoters other than cbh1 promoter or the own promoter of a sso gene, promoters, such as other cellulase promoters, cbh2, egl1 and egl2 or tef1, pgk, gpd and pki, glucoamylase, alpha-amylase, or alcohol dehydrogenase, are mentioned, for example. Various copy numbers usually included in the genome in Hyphomycetes when the transformation with a sso gene was performed
 s s o 遺伝子含有菌株が得られ (Penttilä et al., 1987) 、

The strain which has the sso manifestation ability and the raised secretion ability of the optimal level for growth :

from such strain can be screened.

Therefore, the purpose of this invention — the SSO gene of *S. SEREBISHIE* especially SSO1 gene, and SSO — it is offering *Trichoderma RESEI* to those genes, and the homologous gene of other eukaryotic cells further 2 gene. The array of these genes can be determined from the plasmid which supports them, for example by the double strand dideoxy nucleotide-sequencing method (Zagursky et al., 1986). S. The array of SSO1 gene of *SEREBISHIE* is shown in the array number 1, and the array of SSO2 gene is shown in the array number 3.

Other one purpose of this invention is offering the specific vector containing an SSO gene. Such a vector to yeast is either of the vectors in which a nest is possible for the many copies reproduced autonomously, a single copy plasmid, or a chromosome, as described above. On the other hand, such a vector to *Trichoderma* is the plasmid which can separate a manifestation cassette (promotor-gene-terminator) with a restriction enzyme, and is preferably included in a fungus genome.

One purpose of further others of this invention is offering the yeast stock, the other fungus stocks, and eukaryotic cell system which contain the SSO gene of many copy numbers in the form included in the duplicate PUSUMIDO copy or the chromosome. As for the yeast stock which contains the SSO gene of many copy numbers such, a fungus stock, and an eukaryotic cell system, the production ability of protein, such as hydrolase of for example, a yeast invertase, a *Trichoderma* cellulase, or others, is raised.

Therefore, Sso protein — the construction approach of the new eukaryotic cell which can be discovered with a high level — carrying out — (a) — the DNA array which carries out the code of the Sso protein from a suitable donor living thing — isolating — the vector which supports at least one of the (b) this DNA arrays — building — and — The approach of including what is done for the transformation of the suitable host cell of the vector (c) Obtained by at least one is offered.

One purpose of further others of this invention is containing the DNA array which carries out the code of the protein of foreignness, such as alpha-amylase, a cellulase, or an antibody, or internality further in addition to the SSO gene of many copy numbers, and offering the eukaryotic cell which can discover this protein.

Therefore, the method of increasing the amount of protein production of foreignness or internality is offered by carrying out the superfluous manifestation of the SSO gene. This approach (a) The DNA array which carries out the code of the protein of foreignness or internality is isolated from a suitable donor living thing. (b) The vector which supports at least one of these the DNA arrays is built. (c) — or [carrying out the transformation of the suitable host who discovers Sso protein with a high level, rearranging him by the obtained vector, and obtaining a host cell] — or Carry out the transformation of the suitable host by this vector, carry out the transformation of this transformant to an SSO gene or an SSO gene again with a homologous gene, and the cell to which the production ability of the above-mentioned protein was raised is screened. It includes cultivating a (d) this recombination host cell under the conditions which can discover the above-mentioned protein.

One purpose of further others of this invention is raising secretion ability optimizing Sso protein level using the gene of a different promotor and a different copy number, and by combining an SSO gene with the genes (for example, SEC1 etc.) of others which participate in secretion.

Therefore, this invention is made into the approach of increasing the amount of production of the protein of foreignness or internality by carrying out the superfluous manifestation of an SSO gene and the gene (for example, SEC1) which interacts under existence of the Sso protein of a normal amount or the increased amount. (a) The DNA array which carries out the code of the protein of foreignness or internality is isolated from a suitable donor living thing. (b) The vector which supports at least one of these the DNA arrays is built. (c) — or [carrying out the transformation of the suitable host who does the superfluous manifestation of the gene (for example, SEC1) of others which discover Sso protein with normal level or a high level, and interact with an SSO gene by the obtained vector rearranging him, and obtaining a host cell] — or The transformation of the suitable host is carried out by this vector. This transformant An SSO gene or a gene [homologous / gene / SSO], And a transformation is again carried out with an SSO gene and the gene (for example, SEC1) which interacts. the cell to which the production ability of the above-mentioned protein was raised — screening — and — The approach of including what the recombination host cell (d) Obtained is cultivated for under the conditions which can discover the above-mentioned protein is offered.

One purpose of further others of this invention is made into the approach of increasing production of internality protein. (a) Are gene independent [homologous / gene / an SSO gene or / SSO], or the transformation of the cell which produces internality protein is carried out in collaboration with an SSO gene and the gene (for example, SEC1) which interacts. Rearrange and a cell is obtained. (b) — the transformant which produces this internality

protein with a high level was screened, and protein production ability was raised — It is offering the approach of including what a (c) this recombination cell's is cultivated for under the conditions which can discover this internality protein.

One purpose of further others of this invention is offering the fungus stock containing the DNA array which carries out the code of hydrolase (for example, alpha-amylase and/or glucoamylase) or the lignocellulose hydrolase (for example, a cellulase, hemicellulase, or rig NINAZE) further in addition to the SSO gene of many copy numbers, or its homologue. As for such a fungus stock, the growth on improvement and/or this polymerization compound is promoted for the hydrolysis ability of polymerization compounds, such as starch and lignocellulose.

Therefore, the approach of producing biomass efficiently using a raw material, or hydrolyzing a raw material efficiently is offered.

This approach (a) The DNA array which carries out the code of the hydrolase of internality or foreignness is isolated from a suitable donor living thing. (b) The fungus vector which supports at least one of these the DNA arrays is built. (c) — or [carrying out the transformation of the suitable fungus host who discovers Sso protein with a high level, rearranging him by the obtained vector, and obtaining a host cell] — or Carry out the transformation of the suitable host by this vector, carry out the transformation of this transformant to an SSO gene or an SSO gene with a homologous gene, and the cell to which the production ability of the above-mentioned hydrolase was raised is screened. (d) What the recombination host cell obtained is cultivated for under the conditions which can discover the above-mentioned hydrolase is included.

Moreover, it is made the approach of producing biomass efficiently using a raw material, or hydrolyzing a raw material efficiently by carrying out the superfluous manifestation of an SSO gene and the gene (for example, SEC1) which interacts under existence of the Sso protein of a normal amount or the increased amount further. (a) The DNA array which carries out the code of the hydrolase of internality or foreignness is isolated from a suitable donor living thing. (b) The vector which supports at least one of these the DNA arrays is built. (c) — or [carrying out the transformation of the suitable host who discovers Sso protein and the protein which interacts with a high level, rearranging him under existence of the Sso protein of a normal amount or the increased amount, by the obtained vector, and obtaining a host cell] — or The transformation of the suitable host is carried out by this vector. This transformant An SSO gene or a gene [homologous / gene / SSO], And carry out a transformation again with an SSO gene and the gene (for example, SEC1) which interacts, and the cell to which the production ability of the above-mentioned hydrolase was raised is screened. (d) The approach of including what the recombination host cell obtained is cultivated for under the conditions which can discover the above-mentioned hydrolase is offered.

The above-mentioned recombination cell can be used for the process expected amelioration of production by the single cell, and alcoholic production, or efficient hydrolysis of a raw material.

Example example 1: Cloning of each coding region of SSO1 gene of the *Saccharomyces cerevisiae* origin, and SSO2 gene SSO1 gene and SSO2 gene were isolated as a suppressor of one to temperature sensitivity deficit sec1 mutant (Novick and Scheckman; 1979; Novick et al., 1980). S. SEREBISHIE sf750-14Dalpha stock (alphasec1-1 his4 ura3-52 trp1-289 leu2-3 leu 2-112) (Randy SHIEKKUMAN (RandyScheckman)) University of California, Berkeley, and CA Acquisition It is 2micro base plasmid (it considers as a selective marker) about cDNA of the X2180-1 B-share origin. [pMAC561;] The transformation of TRP1 was carried out by construction (1983) by the yeast cDNA library [Mac night (McKnight) and MAKKONOI (McConaughy) which introduced into content and were built, and the transformant of the Trp-auxotroph in 37 degrees C was selected. Since 37 degrees C showed resistance, growth of this transformant is 36 which is still the non-approving-like conditions to sec 1-1.

It experimented further at 5 degrees C or 35 degrees C. Trp+ phenotype is separated at 36.5 degrees C, and it isolates from four kinds of yeast mutants which show growth.

された DNA (Keränen, 1986) を大腸菌 (*E. coli* ;

It introduced into Hanahan and 1983. The transformation of one to one share of sec of *S. auction* BISHIE was again carried out using the plasmid DNA isolated from this *Escherichia coli* transformant.

Thus, the efficient transformation for making it grow at 36.5 degrees C was attained. When restriction enzyme analysis was performed about these plasmids, it turned out that two kinds of different arrays were collected from the used cDNA library. The base sequence of the insertion DNA originating in two kinds of these different clones 1 and 7 was determined with the double strand dideoxy chain termination method (Zagursky et al., 1986), and the suitable subclone was built using a standard recombinant DNA method (Maniatis et al., 1982) or a standard specific

primer. These two clones contained the open reading frame of 870 nucleotides (clone 1) and 885 nucleotides (clone 7), respectively. Since the amino acid sequence presumed from the above-mentioned nucleotide sequence differed from the amino acid sequence (Aalto et al., 1991) of Sec1 protein, these new genes were named SSO1 and SSO2 (SSO:Suppressor of Sec1 One). Each coding sequence and those presumed amino acid sequences of SSO1 and SSO2 are shown in the array numbers 1 and 3. The plasmid which supports SSO1 and SSO2 gene names it YEpSSO1 and YEpSSO2, respectively, and is shown in drawing 1.

Example 2: Superfluous manifestation of the Sso2 protein in the yeast by which the transformation was carried out by YEpSSO2 Yeast which carried out the transformation by the plasmid pMA56 of control (A) (Ammerer, 1983), or either of YEpSSO(s)2 (B) The sf750-14D stock was grown on the synthetic perfect medium (Sherman et al., 1983) which does not contain Trp.

Ruohonen (1986) に記載されている方法に従って、SDS の

The melt of this yeast cell was obtained under existence. SDS-PAGE separated all 10micro pg(s) of yeast protein that exist in this melt, and it analyzed by Western blotting used on the occasion of detection of the polyclonal antibody and alkali phosphatase conjugation goat anti-rabbit IgG to the Sso2 protein in a rabbit. As shown in drawing 2, in the nature transformer of YEpSSO dimorphism, the amount of secretion of Sso2 protein increased very much.

Example 3:SSO1 gene or SSO2 gene Increase of the different-species protein (bacillus alpha-amylase) production in the yeast sf750-14D stock which carries out a superfluous manifestation Either of the multi-copy plasmids YEpSSO1 and YEpSSO2 which contain SSO1 gene and SSO2 gene, respectively In order to discover more efficiently the plasmid YEpalphaa6[gene containing the bacillus alpha-amylase gene which connected the yeast sf750-14Dalpha stock to support between ADH1 promotor (Ruohonen et al., 1987) and the terminator By excising the control array of 5' edge expected to a promotor element It is embellished (). [modified for] more efficient expression by deleting predicted By inhibitory sequences 5' to the promoter element(Ruohonen et al., 1991;Ruohonen et al., manuscript in preparation, a)] The transformation was carried out. In order to perform the manifestation more efficiently, qualification is added to the above-mentioned bacillus alpha-amylase gene by excising even a promotor element from 5' edge of the control nature array expected (Ruohonen et al., 1991;Ruohonen et al., manuscript in preparation, a). In this way, the obtained yeast stock (VTT-C -92072) containing YEpSSO1 and YEpaa5 or the yeast stock (VTT-C -92073) containing YEpSSO2 and YEpalphaa5 was grown at 24 degrees C on the selective medium. It acted as the monitor of the secretion to the culture medium of alpha-amylase by measuring the activity of alpha-amylase using a FADEBASU (Phadebas) amylase assay kit made in [FERUMASHIA diamond GUNOSU tex AB (Pharmacia Diagnostics AB)] the Sweden country]. These strain VTT-C -92072 and VTT-C -92073 are DOICHIIE on September 30, 1992 as a deposition number 7253 and DSM 7254, respectively. ZAMURUNGU Phone Micro auger NIZUMEN UNTOTSUERUKURUTSUREN GEEMUBE It related to HA [Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM)]. As shown in drawing 3, in the strain (**) which supports SSO2 gene introduced into the strain (**) or the multi-copy plasmid which supports SSO1 gene introduced into the multi-copy plasmid, alpha-amylase activity was improving from the control stock (-) by which a transformation is not carried out. Secretion of alpha-amylase fell even to the level which a control stock shows in the strain (**) from which the strain (**) or YEpSSO2 which removed YEpSSO1 from this transformant was removed. This shows that secretion improves by existence of an SSO gene content plasmid. Western blotting detected the increment in the amount of alpha-amylase protein in a culture culture medium (drawing 4). The notation in drawing 3 and S express a criterion (bacillus alpha-amylase).

Example 4:SSO2 gene Increase of the foreignness protein (bacillus alpha-amylase) in 746 shares of yeast DBY which carries out a superfluous manifestation, and internality protein (invertase) production Between ADH1 promotor (Ruohonen et al., 1987) and a terminator In order to discover more efficiently the plasmid YEpalphaa6 [gene containing the connected bacillus alpha-amylase gene By excising the control array of 5' edge expected to a promotor element It is embellished (). [Ruohonen et al.,] [1991;] Ruohonen et al. and manuscript in preparation and a) S. SEREBISHIE to support 746 shares () of DBY(s) [alpha] his 3**1 leu 2-3 leu 2-112 ura3-52 cghR [DEBITTO BOTTEIN trp 1-289 () [David Botstein; Department of Biology,] [Massachusetts Institute of] They are YEpSSO2 and the plasmid pMA56 (Ammerer, 1983) of control about acquisition] from Technology, Cambridge, and MA.

A transformation is carried out depending on whether it is *****. The selective medium grew this transformant at 30 degrees C, and it acted as the monitor of the secretion of the alpha-amylase to a culture culture medium by

measuring alpha-amylase activity using a FADE bus amylase assay kit (made in [Pharmacia diamond GUNOSU tex AB] a SUEDE country). As shown in drawing 5 , as compared with the control stock (O) by which the transformation was carried out, alpha-amylase activity of strain (**) which supports SSO2 gene introduced into the multi-copy plasmid improved by the plasmid of the control which does not contain an SSO gene. The difference was not accepted at all in growth of yeast by the transformant (-) of control, and the nature transformer of SSO dimorphism (**). Similarly, when the superfluous manifestation of the SSO1 gene was carried out, the amount of secretion of alpha-amylase increased. When measured also with secretion of the invertase which is internal protein from the logarithmic growth phase anaphase to the early stages of a stationary phase, the secretion under these conditions increased. The secretion invertase activity in the nature transformer of SSO1 dimorphism was 1.4 times the transformant of control containing pMA56. Since the alpha-amylase secretion enhancement effect by the superfluous manifestation of an SSO gene becomes more remarkable in a growth anaphase, invertase secretion is also considered to increase more at a growth anaphase. By excising the control nature array expected to be on the ADH1 promotor (to refer to above) used for the SSO2 gene expression in YEpSSO2, SSO2 gene-expression time amount is extended and the long duration existence of the Sso protein with which the amount of secretion increased is attained. Therefore, the final secretion level to the culture medium of bacillus alpha-amylase also increases. The SSO2 gene expression by this qualification ADH1 promotor included in the single copy plasmid also raises the secretion level of Sso protein, and promotes secretion of alpha-amylase.

Example 5: Increase of the foreignness protein (bacillus alpha-amylase) production in the SEC1 overgene manifestation yeast under existence of the functional Sso protein of normal level or the increased level ADH1 promotor [Ruohonen et al., 1987; in order to discover a gene more efficiently By excising the control array of 5' edge expected to a promotor element Between thing (Ruohonen et al., 1991; Ruohonen et al., manuscript in preparation, a)] embellished and a terminator S. SEREBISHIE which supports the plasmid YEpalphaa6 containing the connected bacillus alpha-amylase gene 746 shares of DBY(s) By either [plasmid YEp24H (Aalto et al., 1991; Ruohonen et al., manuscript in preparation b)] the multi-copy plasmid YEpSEC1 which discovers SEC1 gene, and control The transformation was carried out. This transformant was grown at 30 degrees C by the selective medium, and it acted as the monitor of the secretion of the alpha-amylase to a culture culture medium by measuring alpha-amylase activity using a FADE bus amylase assay kit (made in [Pharmacia diamond GUNOSU tex AB] the Sweden country). As shown in drawing 6 , as compared with the strain (O) by which the transformation was carried out, alpha-amylase activity of strain (**) which supports SEC1 gene introduced into the multi-copy plasmid improved by the plasmid which does not contain SEC1 gene. In two kinds of this transformant, the difference was not accepted in that growth at all.

When coincidence was made to carry out the superfluous manifestation of SEC1 protein and the SEC2 protein, secretion of alpha-amylase was promoted further. The plasmid which discovers an SSO gene can come to hand from VTT [a biotechnology technical laboratory (Biotechnical Laboratory; Espoo, Finland)].

Example 6: Manifestation in isolation of the Trichoderma sso gene by the manifestation in yeast, and the Trichoderma of this gene The yeast manifestation gene bank prepared from 9414 shares (it indicates to Buchert et al. and the Finland patent application No. 922373) of T. RESEI QM Saccharomyces cerevisiae H 458-share [Aalto et al., 1993; alpha SUC2 ade 2-1 can 1-100 his3- 11 and 15 leu 2-3,112 trp 1-1 ura 3-1 sso1-delta1::URA3 A transformation is introduced and carried out to sso2-delta2::leu2::(GAL1: sso1, HIS3)]. The transformant was obtained by selecting the Ura demand nature variant in a galactose culture medium. This transformant was moved to the glucose culture medium, this plasmid was taken out from that growth colony, the transformation was introduced and carried out to the above-mentioned strain, and the complementarity was checked. Thus, the clone which shows the relief ability to the ** Sso protein consumption in a glucose culture medium was obtained. The plasmid corresponding to this clone was named PMS51. S. SEREBISHIE stock which supports the obtained plasmid PMS 51 is October 5, 1993 DOICHIE. ZAMURUNGU phon Micro auger NIZUMENUNTOTSUERUKURUTSUREN Gaea Em BE It ****ed to HA (DSM) (deposition number: DSM8604). The chromosome copy of this gene is a chromosome cosmid library by using 5' edge of the cDNA clone prepared by PCR.

(Mäntylä et al., 1992) から単離される。また、該コスミ

The cosmid corresponding to [DO is isolated from the clone which gives a signal and] Above cDNA is T. RESEI (Penttilä et al., 1987) which produces a CBHI-Fab molecule. It is introduced into a stock -91418 (CBS 287.91), i.e., VTT-D, and a transformation is carried out (it indicates to

Nyyssönen et al. and (patent application)). Production of CBHI-Fab is investigated from the extra-cellular matrix in a Solca-floc culture medium (Nyyssönen et al., patent application).

Example 7: Isolation of the fungus sso gene by different-species hybridization Chromosome DNA was isolated from *Saccharomyces cerevisiae* which is a fungus kind, *Schizosaccharomyces POMBE*, *Clive ROMISESU RAKUTISU Kluyveromyces lactis*, *Pichia stay PITISU* (*Pichia stipitis*), an *Aspergillus NIDEYU lance* (*Aspergillus nidulans*), and *Trichoderma RESEI*, respectively. This DNA was digested with the restriction enzyme HindIII, fractionation was carried out by agarose gel electrophoresis 0.8%, and the blot was carried out on the nylon filter. The Southern blot hybridization of this filter was performed under different strict conditions, using a yeast SSO1 gene coding region as a probe. When hybridization was performed at 35 degrees C in the mixture containing 30% formaldehyde, 6xSSC, a 10xDenhardt solution, 5%SDS, the 100microg [/ml] herring sperm DNA, and 10microg [/ml] poly A and was washed twice for 30 minutes by 2xSSC and 0.1%SDS, they are S. SEREBISHIE, K. RAKUTISU, P. SUTIPITISU, and T.

Some bands which carried out the hybrid appeared to DNA of the Leh Ceh origin (drawing 8). Moreover, when hybridization was performed under the conditions which are not not much strict, hybridization was observed also about S. POMBE. The hybrid of the T. Leh Ceh gene library built in lambdaEMBL3 (Frischauf et al., 1983) vector was carried out by the above-mentioned actuation. The clone which gives a hybridization signal was refined and the map of those fields that are carrying out the hybrid was carried out by digestion and the Southern blot hybridization of those DNA. Three kinds of lambda clones which carried out the hybrid were named TSSOa, TSSOb, and TSSOc, respectively. These clones are DOICHIE on October 5, 1993. ZAMURUNGU Phone WIKIROOGANIZUMEN UNTO TSUERUKURUTSUREN Gaea Em BE It ****ed to HA (DSM) (deposition number: DSM 8601, DSM 8602, and DSM 8603).

Deposition microorganism The following microorganisms were deposited with DOICHIE ZAMURUNGU phon micro auger NIZUMEN UNTO TSUERUKURUTSUREN Gaea em BE HA (DSM; Germany and Brunswick D-3300 MASHU oader VEKU1B) based on the swine plague treaty.

Strain Deposition number Deposition day *Saccharomyces cerevisiae* DSM 7253 September 30, 1992 VTT-C - 92072 (plasmid YEpSSO1 is supported)

Saccharomyces cerevisiae DSM 7254 September 30, 1992 VTT-C -92073 (plasmid YEpSSO2 is supported)

Saccharomyces cerevisiae DSM 8604 1993 year 10 month 5 day H458 (VTT-C -93002)

(Plasmid pMS51 is supported)

Bacteriophage lambda stock DSM 8601 October 5, 1993 TSSOa (VTT-H -93001)

Bacteriophage lambda stock DMS 8602 October 5, 1993 TSSOb (VTT-H -93002)

Bacteriophage lambda stock DMS 8603 October 5, 1993 TSSOc (VTT-H -93003)

Aalto, M.K., Keränen, S. and Ronne, H. 1992. A family of proteins involved in intracellular transport. *Cell* 68, 181-182.

Aalto, M.K., Ronne, H. and Keränen, S. 1993. Yeast syntaxins Sso1p and Sso2p belong to a family of membrane proteins that function in vesicular transport. *EMBO J.* 12, (in press).

Aalto, M.K., Ruohonen, L., Hosono, K. and Keränen, S. 1991. Cloning and sequencing of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *SEC1* gene localized on chromosome IV. *Yeast* 7, 643-650.

Ammerer, G. 1983. Expression of genes in yeast using the *ADC1* promoter. *Methods Enzymol.* 101, 192-201.

Baldari, C., Murray, J.A.H., Ghiara, P., Cesareni, G. and Galeotti, C.L. 1987. A novel peptide leader which allows efficient secretion of a fragment of human interleukin 1 β in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 6, 229-234.

Becherer, K.A. and Jones, E.W., 1992. Role of the *PEP12* gene product in vacuolar targeting in yeast. EMBL Data Bank 31, accession number M90395.

Bennett, M.K., Calakos, N. and Scheller, R.H. 1992. Syntaxin: A synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at pre synaptic active zones. *Science* 257, 255-259.

Buchert, J., Penttilä, M., Siika-aho, M., Saloheimo, A., Ranua, M. and Viikari, L. 1992. Mannanaasientsyymit, niitä koodittavat geenit ja menetelmä näiden eristämiseksi sekä menetelmä lignoselluloosapitoisen massan valkaisemiseksi (Mannanase enzymes, the encoding genes and method for their isolation, and a method for bleaching lignocellulose containing materials). FI Pat. Appl. 92 2373.

Buckholz, R.G. and Gleeson, M.A. 1991. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Bio/Technology* 9, 1067-1072.

Dunn-Coleman, N., Bloebaum, P., Berka, R., Bodie, E., Robinson, N., Armstrong, G., Ward, M., Przetak, M., Carter, G., LaCost, R., Wilson, L., Kodama, K., Balu, E., Bower, B., Lamsa, M. and Heinsohn, H. 1991. Commercial levels of chymosin production by *Aspergillus*. *Bio/Technology* 9: 976-981.

Fawell, E., Hook, S. and Armstrong, J., 1989. Nucleotide sequence of a gene encoding a YPT1-related protein from *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucl. Acid Res.*

Bibliography 11, 4373.

Frischauf, A.-M., Lerach, H., Poustka, A. and Murray, N., 1983. Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* 170, 827-842.

Gerst, F.E., Rodgers, L., Riggs, M. and Wigler, M. 1992. *SNC1*, a yeast homolog of the synaptic vesicle-associated membrane protein/synaptobrevin gene family: Genetic interactions with the *RAS* and *CAP* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4338-4342.

Greenberg, G., Shelness, G.S. and Blobel, G., 1989. A subunit of mammalian signal peptidase is homologous to yeast *SEC11* protein. *J. Biol. Chem.* 264, 15762-15765.

Hallborn, J., Penttilä, M., Ojamo, H., Keränen, S. & Hahn-Hägerdal, B. 1990. Xylose utilization by recombinant yeasts. *International Pat. Appl. WO* 91/15588.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.

Hardwick, K.G. and Pelham, H.R.B. 1992. *SED5* encodes a 39 KD integral membrane protein required for vesicular transport between the ER and the Golgi complex. *EMBL Data Bank* 32, accession number X66980.

Harkki, A., Uusitalo, J., Bailey, M., Penttilä, M. & Knowles, J.K.C. 1989. A novel fungal expression system: secretion of active calf chymosin from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology* 7: 596-603.

Haubruck, H., Prange, R., Vorgias, C. and Gallwitz, D. 1989. The ras-related mouse *ypt1* protein can functionally replace the YTP1 gene product in yeast. *EMBO J.* 8, 1427-1432.

Hirai, Y., Takebe, K., Takashina, M., Kobayashi, S. and Takeichi, M. 1992. Epimorphin: a mesenchymal protein essential for epithelial morphogenesis. *Cell* 69, 471-481.

Inoue, A., Obata, K. and Agakawa, K. 1992. Cloning and sequence analysis of cDNA for a neuronal cell membrane antigen, HPC-1. *J. Biol. Chem.* 267, 10613-10619.

Irani, M.H. and Kilgore, T.L. 1988. High level expression in yeast. European patent application EP 0 284 044 A1.

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. 1983. Transformation of intact yeast cells with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153, 163-168.

Jeenes, D., MacKenzie, D., Roberts, I. and Archer, D. 1991. Heterologous protein production by filamentous fungi. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, vol. 9. Pp. 327-367.

Keränen, S. 1986. Synthesis and processing of Semliki forest virus polyprotein in *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast type glycosylation of E1 envelope protein. *Gene* 18, 267-275.

Lamsa, M. and Bloebaum, P. 1990. Mutation and screening to increase chymosin yield in a genetically-engineered strain of *Aspergillus avamori*. *J. Ind. Microbiol.* 5, 229-238.

Lopez, M.C., Nicand, J.M. and Gaillardin, C., 1992. SEC14 deleted mutant of *Carrowia lipolytica* is altered in the secretion and differentiation processes. 16th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology. Vienna, Austria, Aug. 15-21, 1992, *Yeast* 8 (Spec. Issue) p. 473.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning, A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Martegani, E., Forlani, N., Mauri, I., Porro, D., Schleuning, W.D. and Alberghina, L. 1992. Expression of high levels of human tissue plasminogen activator in yeast under the control of an inducible GAL promoter. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 604-608.

McKnight, G.L. and McConaughy, B.L. 1983. Selection of functional cDNAs by complementation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4412-4416.

Mäntylä, A., Rossi, H., Vanhanen, S., Penttilä, M., Suominen, P. and Nevalainen, H. 1992. Electrophoretic karyotyping of wild type and mutant *Trichoderma reesei* strains. *Current Genetics* 21:471-477.

Novick, P. and Scheckman, R., 1979. Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1858-1862.

Novick, P., Ferro, S. and Scheckman, R. 1981. Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell* 25, 461-469.

Novick, P., Fields, C. and Scheckman, R. 1980. Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* 21, 205-215.

Nyyssönen, E., Keränen, S., Penttilä, M., Takkinen, K. and Knowles, J. K. C. 1990. Immunoglobulin production by *Trichoderma*. *US Pat. Appl.* 552757.

Nyyssönen, E., Penttilä, M., Harkki, A., Saloheimo, A., Knowles, J.K.C. and Keränen, S. 1993. Efficient production of antibodies by the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology* 11, 591-595.

- Penttilä, M.E., Nevalainen, H., Rättö, M., Salminen, E. and Knowles, J.K.C. 1987. A versatile transformation system for the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene* 51, 155-164.
- Protodopov, V., Govindan, B., Novick, P. and Gerst, J.E. 1993. Homologs of the synaptobrevin/VAMP family of synaptic vesicle proteins function on the late secretory pathway in *S. cerevisiae*. *Cell* 74, (in press).
- Romanos, M.A., Scorer, C.A. and Clare, J.J. 1992. Foreign gene expression in yeast: a Review. *Yeast* 8, 423-488.
- Ruohonen, L., Hackman, P., Lehtovaara, P., Knowles, J.C.K. and Keränen, S. 1987. Efficient secretion of *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase by its own signal peptide in *Saccharomyces cerevisiae* host cells. *Gene* 59, 161-170.
- Ruohonen, L., Penttilä, M. and Keränen, S. 1991. Optimization of *Bacillus* α -amylase production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7, 337-346.
- Sakai, A., Shimizu, Y. and Hishinuma, F. 1988. Isolation and characterization of mutants which show an oversecretion phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 119, 499-506.
- Schuster, J.R., Moyer, D.L., Lee, H., Dennis, A., Smith, B. and Merryweather, J.P. 1989. *Gene* 83, 47-55.
- Segev, N., Mulholland, J. and Botstein, D., 1988. The yeast GTP-binding YTP1-protein and a mammalian counterpart are associated with the secretion machinery. *Cell* 52, 915-924.
- Sikorski, R.S. and Hieter, P. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.
- Sleep, D., Belfield, G.P., Ballance, D.J., Steven, J., Jones, S. Evans, L.R., Moir, P.D. and Goodey, A.R. 1991. *Saccharomyces cerevisiae* strains that overexpress heterologous proteins. *Bio/Technology* 9, 183-187.
- Smith, R.A., Duncan, M.J. and Moir, D.T. 1985. Heterologous protein secretion from yeast. *Science* 229, 1219-1224.
- Suzuki, K., Ichikawa, K. and Jigami, Y. 1989. Yeast mutants with enhanced ability to secrete human lysozyme: Isolation and identification of a protease-deficient mutant. *Mol. Gen. Genet.* 219, 58-64.
- Vanoni, M., Porro, D., Martegani, E. and Alberghina, L. 1989. Secretion of *Escherichia coli* β -galactosidase in *Saccharomyces cerevisiae* using the signal

sequence from the glucoamylase-encoding *ST42* gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 164, 1331-1338.

Ward, M., Wilson, L.J., Kodama, K.H., Rcy, M.W. and Berka, R.M. 1990. Improved production of calf chymosin in *Aspergillus* by expression as a glucoamylase-chymosin fusion.

Wilson, D.W., Wilcox, C.A., Flynn, G.C., Chen, E., Unang, W-J., Henzel, W.J., Block, M.R., Ullrich, A. and Rothman, J.E., 1989. A fusion protein required for vehicle-mediated transport in both mammalian cells and yeasts. Nature 339, 355-359.

Zagursky, R.J., Berman, M.L., Baumeister, K. and Lomax, N. 1986. Rapid and easy sequencing of large linear double stranded DNA and supercoiled plasmid DNA. Gene Anal. Techn. 2, 89-94.

Zaraoui, A., Touchot, N., Chardin, P. and Tavitian, A. 1989. The human Rab genes encode family of GTP-binding proteins related to yeast YTP1 and SEC4 products involved in secretion. J. Biol. Chem. 264, 12394-12401.

Array table (i) general information (i) applicant : (A) -- name: -- BAL tee-on Theque NIRINEN Talkie
MUSUKESUKUSU (B) -- street: -- BUORIMIEHENTIE Five (C) City : Espo (E) Country : Finland (F) -- zip code
[ZIP]: -- FIN-02150 name [of (ii) invention]: -- it is based on a recombination eukaryotic cell -- secretion
protein Production to which quality increased (iii) The number of arrays: 4 (iv) computer read gestalt : (A) -- class
[of medium]: -- floppy disk (B) computer: -- IBM PC use good (C) actuation system :P C-DOS/MS-DOS (D)
software: Patent in release #1.0, version #1.25 (EPO)
(vi) Precedence application data : (A) -- application number: -- FI 92 4494 (B) Filing date of application :
Information about October 6, 1992 array [(2)] number 1: The description of the (i) array : (A) -- die-length [of an
array]: -- 870 base pair (B) Mold of an array : Nucleic acid (C) The number of chains : Single strand (D) --
topology: -- the shape of a straight chain class [of (ii) molecule]: -- mRNA from cDNA (vi) origin (A) -- living
thing name: -- *Saccharomyces cerevisiae* (B) stock: X2180-1B The (ix) description: The notation showing (A)
name / the description: CDS (B) existence location : 1..870 (xi) array: Array number 1
ATG AGT TAT AAT AAT CCG TAC CAG TTG GAA ACC CCT TTT GAA GAG TCA 48
Met Ser Tyr Asn Asn Pro Tyr Gln Leu Glu Thr Pro Phe Glu Glu Ser
1 5 10 15
TAC GAG TTG GAC GAA GGT TCG AGC GCT ATC GGT GCT GAA GGC CAC GAT 96
Tyr Glu Leu Asp Glu Gly Ser Ser Ala Ile Gly Ala Glu Gly His Asp
20 25 30
TTC GTG GGC TTC ATG AAT AAG ATC AGT CAA ATC AAT CGC GAT CTC GAT 144
Phe Val Gly Phe Met Asn Lys Ile Ser Gln Ile Asn Arg Asp Leu Asp
35 40 45
AAG TAC GAC CAT ACC ATC AAC CAG CTC GAT TCT TTG CAT AAG AGG CTA 192
Lys Tyr Asp His Thr Ile Asn Gln Val Asp Ser Leu His Lys Arg Leu
50 55 60

JP,08-501695,A [DETAILED DESCRIPTION]

CTG ACC GAA GTT AAT GAG GAG CAA GCA AGT CAC TTA AGG CAC TCC CTG	240
Leu Thr Glu Val Asn Glu Glu Gln Ala Ser His Leu Arg His Ser Leu	
65 70 75 80	
 CAC AAC TTC GTC GCA CAA GCC ACG GAC TTG CAG TTC AAA CTG AAA AAT	288
Asp Asn Phe Val Ala Gln Ala Thr Asp Leu Gln Phe Lys Leu Lys Asn	
85 90 95	
 CAG ATT AAA AGT GCC CAA AGG GAT GGG ATA CAT GAC ACC AAC AAG CAA	336
Glu Ile Lys Ser Ala Gln Arg Asp Gly Ile His Asp Thr Asn Lys Gln	
100 105 110	
 CCT CAG GCG GAA AAC TCC AGA CAA AGA TTT TTG AAG CTT ATC CAG GAC	384
Ala Gln Ala Glu Asn Ser Arg Gln Arg Phe Leu Lys Leu Ile Gln Asp	
115 120 125	
 CAC AGA ATT GTG GAT TCC AAC TAC AAG GAG GAG AAT AAA GAG CAA GCC	432
Tyr Arg Ile Val Asp Ser Asn Tyr Lys Glu Glu Asn Lys Glu Gln Ala	
130 135 140	
 CAG AGG CAG TAT ATG ATC ATT CAA CCA GAG GCC ACC GAA GAT GAA CTT	480
Lys Arg Gln Tyr Met Ile Ile Gln Pro Glu Ala Thr Glu Asp Glu Val	
145 150 155 160	
 CAA GCA GCC ATA AGC GAT GTA GGG GGC CAG CAG ATC TTC TCA CAA GCA	528
Glu Ala Ala Ile Ser Asp Val Gly Gly Gln Gln Ile Phe Ser Gln Ala	
165 170 175	
 CTG TTG AAT GCT AAC AGA CGT GGG GAA GCC AAG ACT GCT CTT GCG GAA	576
Leu Leu Asn Ala Asn Arg Arg Gly Glu Ala Lys Thr Ala Leu Ala Glu	
180 185 190	
 CTC CAG GCA AGC CAC CAA GAG TTA TTC AAA CTA GAA AAA TCC ATG GCA	624
Val Gln Ala Arg His Gln Glu Leu Leu Lys Leu Glu Lys Ser Met Ala	
195 200 205	
 CAA CTT ACT CAA TTG TTT AAT GAC ATG GAA GAA CTC GTA ATA GAA CAA	672
Glu Leu Thr Gln Leu Phe Asn Asp Met Glu Glu Leu Val Ile Glu Gln	
210 215 220	
 CAA GAA AAC GTA GAC GTC ATC GAC AAG AAC GTT GAA GAC GCT CAA CTC	720
Gln Glu Asn Val Asp Val Ile Asp Lys Asn Val Glu Asp Ala Gln Leu	
225 230 235 240	
 CAC GTA GAA CAG GGT GTC GGT CAT ACC GAT AAA GCC GTC AAG AGT GCC	768
Asp Val Glu Gln Gly Val Gly His Thr Asp Lys Ala Val Lys Ser Ala	
245 250 255	
 ACA AAA GCA AGA AAG AAC AAG ATT AGA TGT TGG TTG ATT GTA TTC GCC	816
Arg Lys Ala Arg Lys Asn Lys Ile Arg Cys Trp Leu Ile Val Phe Ala	
260 265 270	
 ATC ATT GTA GTC GTT GTT GTT GTC GTT GTT GTC CCA GCC GTT GTC AAA	864
Ile Ile Val Val Val Val Val Val Val Val Val Val Pro Ala Val Val Lys	
275 280 285	
 ACG CGT	870
Thr Arg	
290	

(2) Information about the array number 2: The description of the (i) array: The die length of the (A) array: 290
 amino acid Mold of the (B) array : Amino acid (D) topology: The shape of a straight chain The class of (ii) molecule:

IP,08-501695,A [DETAILED DESCRIPTION]

```

Met Ser Tyr Asn Asn Pro Tyr Gln Leu Glu Thr Pro Phe Glu Glu Ser
 1           5           10           15
Tyr Glu Leu Asp Glu Gly Ser Ser Ala Ile Gly Ala Glu Gly His Asp
          20           25           30
Phe Val Gly Phe Met Asn Lys Ile Ser Gln Ile Asn Arg Asp Leu Asp
          35           40           45
Lys Tyr Asp His Thr Ile Asn Gln Val Asp Ser Leu His Lys Arg Leu
          50           55           60
Leu Thr Glu Val Asn Glu Glu Gln Ala Ser His Leu Arg His Ser Leu
          65           70           75           80
Asp Asn Phe Val Ala Gln Ala Thr Asp Leu Gln Phe Lys Leu Lys Asn
          85           90           95
Glu Ile Lys Ser Ala Gln Arg Asp Gly Ile His Asp Thr Asn Lys Gln
          100          105          110
Ala Gln Ala Glu Asn Ser Arg Gln Arg Phe Leu Lys Leu Ile Gln Asp
          115          120          125

```

Protein (xi) array: Array number 2

```

Tyr Arg Ile Val Asp Ser Asn Tyr Lys Glu Glu Asn Lys Glu Gln Ala
 130           135           140
Lys Arg Gln Tyr Met Ile Ile Gln Pro Glu Ala Thr Glu Asp Glu Val
145           150           155           160
Glu Ala Ala Ile Ser Asp Val Gly Gly Gln Gln Ile Phe Ser Gln Ala
          165           170           175
Leu Leu Asn Ala Asn Arg Arg Gly Glu Ala Lys Thr Ala Leu Ala Glu
          180           185           190
Val Gln Ala Arg His Gln Glu Leu Leu Lys Leu Glu Lys Ser Met Ala
          195           200           205
Glu Leu Thr Gln Leu Phe Asn Asp Met Glu Glu Leu Val Ile Glu Gln
          210           215           220
Gln Glu Asn Val Asp Val Ile Asp Lys Asn Val Glu Asp Ala Gln Leu
          225           230           235           240
Asp Val Glu Gln Gly Val Gly His Thr Asp Lys Ala Val Lys Ser Ala
          245           250           255
Arg Lys Ala Arg Lys Asn Lys Ile Arg Cys Trp Leu Ile Val Phe Ala
          260           265           270
Ile Ile Val Val Val Val Val Val Val Val Val Pro Ala Val Val Lys
          275           280           285
Thr Arg
          290

```

(2) Information about the array number 3: The description of the (i) array : (A) -- die-length [of an array]: -- 885
 base pair (B) Mold of an array : Nucleic acid (C) The number of chains : Single strand (D) -- topology: -- the
 shape of a straight chain class [of (ii) molecule]: -- mRNA from cDNA (vi) origin (A) -- living thing name: --
 Saccharomyces cerevisiae (B) stock: -- X2180-1B The (ix) description: Notation:CDS showing (A) name / the
 description (B) existence location : 1..885 (xi) array: -- array number 3

IP,08-501695,A [DETAILED DESCRIPTION]

ATG AGC AAC CCT AAT CCT TAT GAG AAT AAC AAT CCG TAC GCT GAA AAC	48
Met Ser Asn Ala Asn Pro Tyr Glu Asn Asn Asn Pro Tyr Ala Glu Asn	
1 5 10 15	
AT GAA ATG CAA GAG GAC TTG AAC AAT GCT CCT ACT GGT CAC TCA GAT	96
Tyr Glu Met Gln Glu Asp Leu Asn Asn Ala Pro Thr Gly His Ser Asp	
20 25 30	
AGT AGC GAC GAT TTC GTA GCT TTT ATG AAC AAG ATC AAC TCA ATA AAT	144
Gly Ser Asp Asp Phe Val Ala Phe Met Asn Lys Ile Asn Ser Ile Asn	
35 40 45	
GCT AAC TTG TCC AGG TAC GAA AAC ATT ATC AAC CAA ATT GAT GCG CAA	192
Ala Asn Leu Ser Arg Tyr Glu Asn Ile Ile Asn Gln Ile Asp Ala Gln	
50 55 60	
TAC AAA GAC CTA CTT ACT CAA GTG AGT GAG GAA CAG GAG ATG GAA TTG	240
His Lys Asp Leu Leu Thr Gln Val Ser Glu Glu Gln Glu Met Glu Leu	
65 70 75 80	

IP,08-501695,A [DETAILED DESCRIPTION]

AGA CGT TCT TTG GAC GAT TAC ATC TCT CAG GCC ACA GAT TTG CAG TAT	288
Arg Arg Ser Leu Asp Asp Tyr Ile Ser Gln Ala Thr Asp Leu Gln Tyr	
85 90 95	
CAA TTG AAA GCG GAT ATC AAA GAT GCC CAG AGA GAC GGA TTG CAC GAC	336
Gln Leu Lys Ala Asp Ile Lys Asp Ala Gln Arg Asp Gly Leu His Asp	
100 105 110	
TCT AAT AAA CAG GCA CAA GCT GAA AAT TGC AGA CAG AAA TTC TTA AAA	384
Ser Asn Lys Gln Ala Gln Ala Glu Asn Cys Arg Gln Lys Phe Leu Lys	
115 120 125	
TTA ATT CAA GAC TAC AGA ATT ATC GAT TCT AAC TAC AAA GAA GAA AGC	432
Leu Ile Gln Asp Tyr Arg Ile Ile Asp Ser Asn Tyr Lys Glu Glu Ser	
130 135 140	
AAA GAG CAG GCG AAG AGA CAG TAC ACA ATT ATC CAA CCG GAA GCC ACT	480
Lys Glu Gln Ala Lys Arg Gln Tyr Thr Ile Ile Gln Pro Glu Ala Thr	
145 150 155 160	
GAC GAA GAA GTG GAA GCC GCC ATC AAC GAT GTC AAT GGC CAG CAG ATC	528
Asp Glu Glu Val Glu Ala Ala Ile Asn Asp Val Asn Gly Gln Gln Ile	
165 170 175	
FTT TCC CAA GCG TTG CTA AAC GCC AAT AGA CGT GGT GAG GCC AAG ACA	576
Phe Ser Gln Ala Leu Leu Asn Ala Asn Arg Arg Gly Glu Ala Lys Thr	
180 185 190	
ACA TTG GCC GAA GTA CAG GCT AGA CAT CAA GAG TTG TTG AAG TTG GAA	624
Ala Leu Ala Glu Val Gln Ala Arg His Gln Glu Leu Leu Lys Leu Glu	
195 200 205	
AAA ACA ATG GCT GAA CTT ACC CAA TTG TTC AAT GAC ATG AAA GAG TTG	672
Lys Thr Met Ala Glu Leu Thr Gln Leu Phe Asn Asp Met Lys Glu Leu	
210 215 220	
ATC ATC GAA CAA CAA GAA AAT GTG GAT GTC ATT GAC AAA AAC CTC GAA	720
Val Ile Glu Gln Gln Glu Asn Val Asp Val Ile Asp Lys Asn Val Glu	
225 230 235 240	
SAC GCT CAG CAA GAT GTA GAG CAA GGT GTG GGT CAC ACC AAC AAG GCC	768
Asp Ala Gln Gln Asp Val Glu Gln Gly Val Gly His Thr Asn Lys Ala	
245 250 255	
JTT AAG AGT GCC AGA AAA GCA AGA AAA AAC AAA ATA AGA TGT TTG ATC	816
Val Lys Ser Ala Arg Lys Ala Arg Lys Asn Lys Ile Arg Cys Leu Ile	
260 265 270	
ATC TGC TTT ATT ATC TTT GCT ATT GTT GTT GTC GTT GTG GTT GTT CCA	864
Ile Cys Phe Ile Ile Phe Ala Ile Val Val Val Val Val Val Val Pro	
275 280 285	
FCC GTT GTG GAA ACA AGA AAG	885
Ser Val Val Glu Thr Arg Lys	
290 295	

(2) Information about the array number 4: The description of the (i) array: The die length of the (A) array: 295
 amino acid Mold of the (B) array : Amino acid (D) topology: The shape of a straight chain The class of (ii) molecule:

IP,08-501695,A [DETAILED DESCRIPTION]

```

Met Ser Asn Ala Asn Pro Tyr Glu Asn Asn Asn Pro Tyr Ala Glu Asn
 1           5           10           15
Tyr Glu Met Gln Glu Asp Leu Asn Asn Ala Pro Thr Gly His Ser Asp
          20           25           30
Gly Ser Asp Asp Phe Val Ala Phe Met Asn Lys Ile Asn Ser Ile Asn
          35           40           45
Ala Asn Leu Ser Arg Tyr Glu Asn Ile Ile Asn Gln Ile Asp Ala Gln
          50           55           60
His Lys Asp Leu Leu Thr Gln Val Ser Glu Glu Gln Glu Met Glu Leu
          65           70           75           80
Arg Arg Ser Leu Asp Asp Tyr Ile Ser Gln Ala Thr Asp Leu Gln Tyr
          85           90           95
Gln Leu Lys Ala Asp Ile Lys Asp Ala Gln Arg Asp Gly Leu His Asp
          100          105          110

Ser Asn Lys Gln Ala Gln Ala Glu Asn Cys Arg Gln Lys Phe Leu Lys
          115          120          125
Leu Ile Gln Asp Tyr Arg Ile Ile Asp Ser Asn Tyr Lys Glu Glu Ser
          130          135          140
Lys Glu Gln Ala Lys Arg Gln Tyr Thr Ile Ile Gln Pro Glu Ala Thr
          145          150          155          160
Asp Glu Glu Val Glu Ala Ala Ile Asn Asp Val Asn Gly Gln Gln Ile
          165          170          175

Phe Ser Gln Ala Leu Leu Asn Ala Asn Arg Arg Gly Glu Ala Lys Thr
          180          185          190

```

Protein (xi) array: Array number 4

```

Ala Leu Ala Glu Val Gln Ala Arg His Gln Glu Leu Leu Lys Leu Glu
          195          200          205
Lys Thr Met Ala Glu Leu Thr Gln Leu Phe Asn Asp Met Lys Glu Leu
          210          215          220
Val Ile Glu Gln Gln Glu Asn Val Asp Val Ile Asp Lys Asn Val Glu
          225          230          235          240
Asp Ala Gln Gln Asp Val Glu Gln Gly Val Gly His Thr Asn Lys Ala
          245          250          255
Val Lys Ser Ala Arg Lys Ala Arg Lys Asn Lys Ile Arg Cys Leu Ile
          260          265          270
Ile Cys Phe Ile Ile Phe Ala Ile Val Val Val Val Val Val Val Pro
          275          280          285
Ser Val Val Glu Thr Arg Lys
          290          295

```

[Translation done.]

NOTICES *

PO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

**** shows the word which can not be translated.

In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

Drawing 1 A]

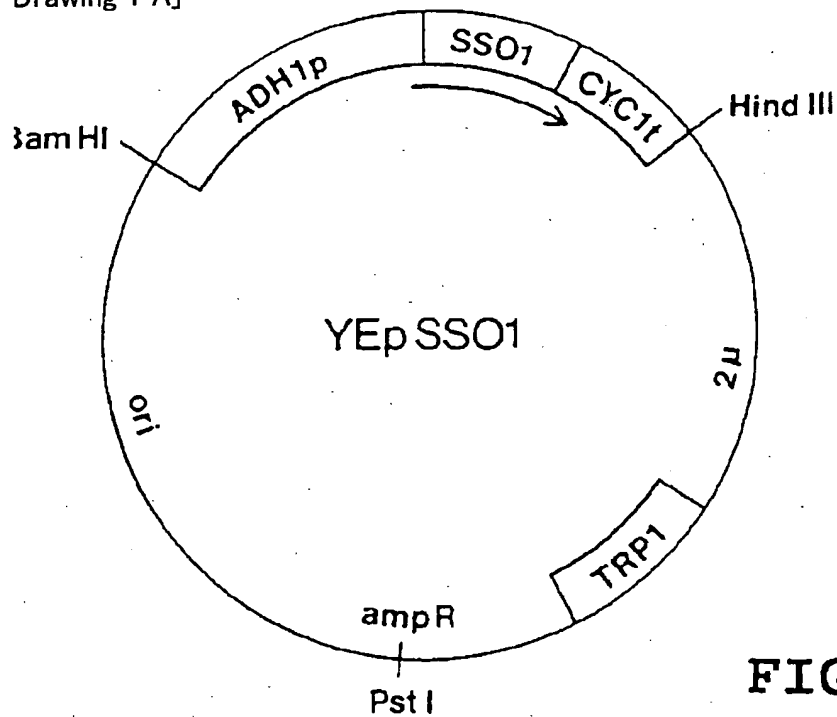


FIG. 1A

Drawing 1 B]

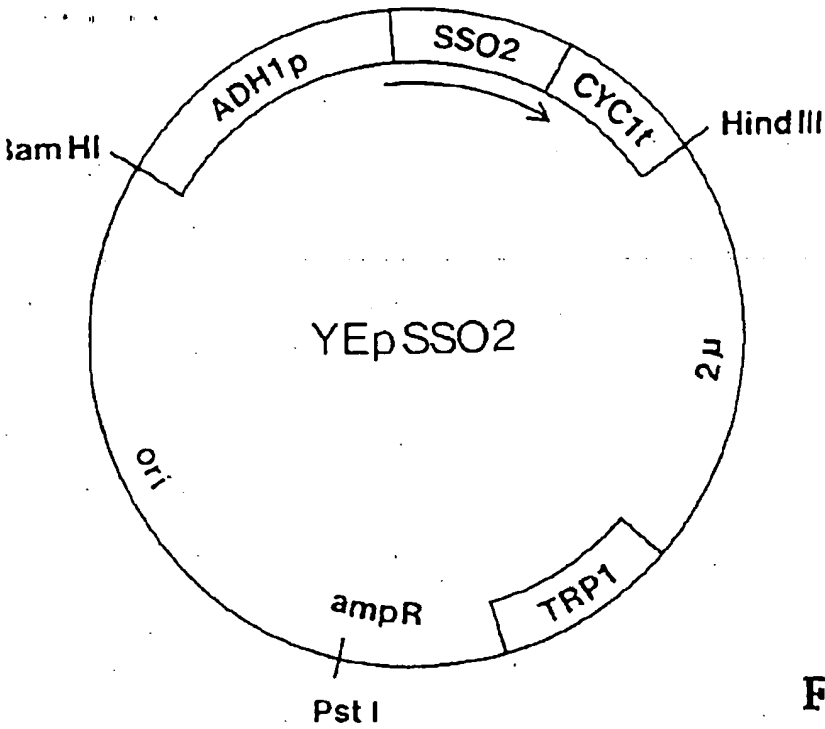


FIG. 1B

[Drawing 2]
A B


3so2p- 

FIG. 2

[Drawing 3]

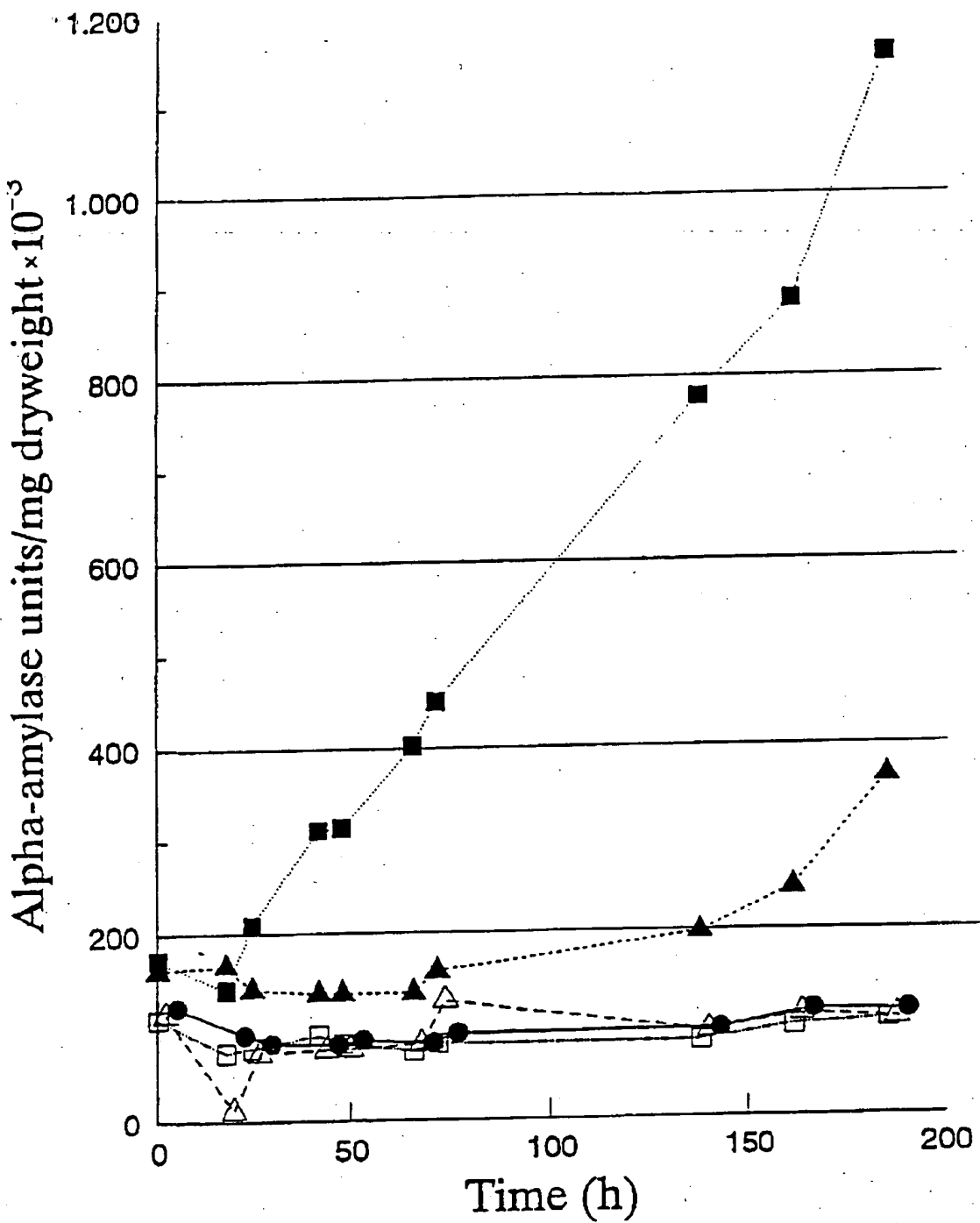


FIG. 3

[Drawing 4]

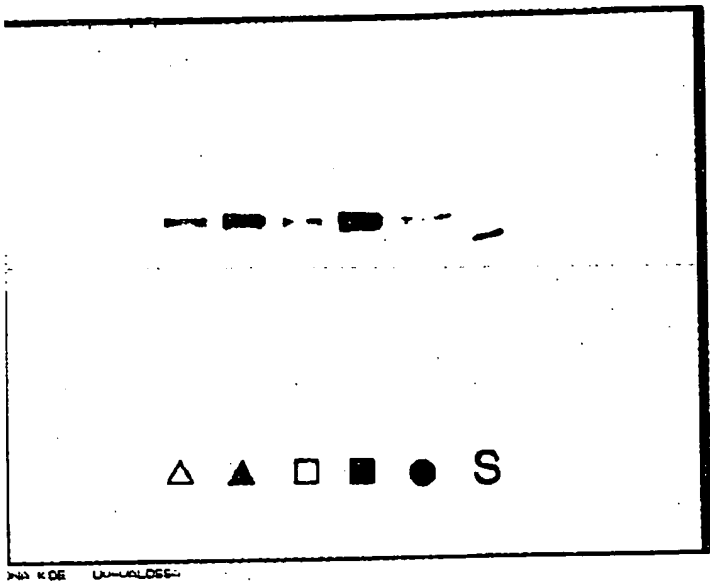


FIG. 4

Drawing 5]

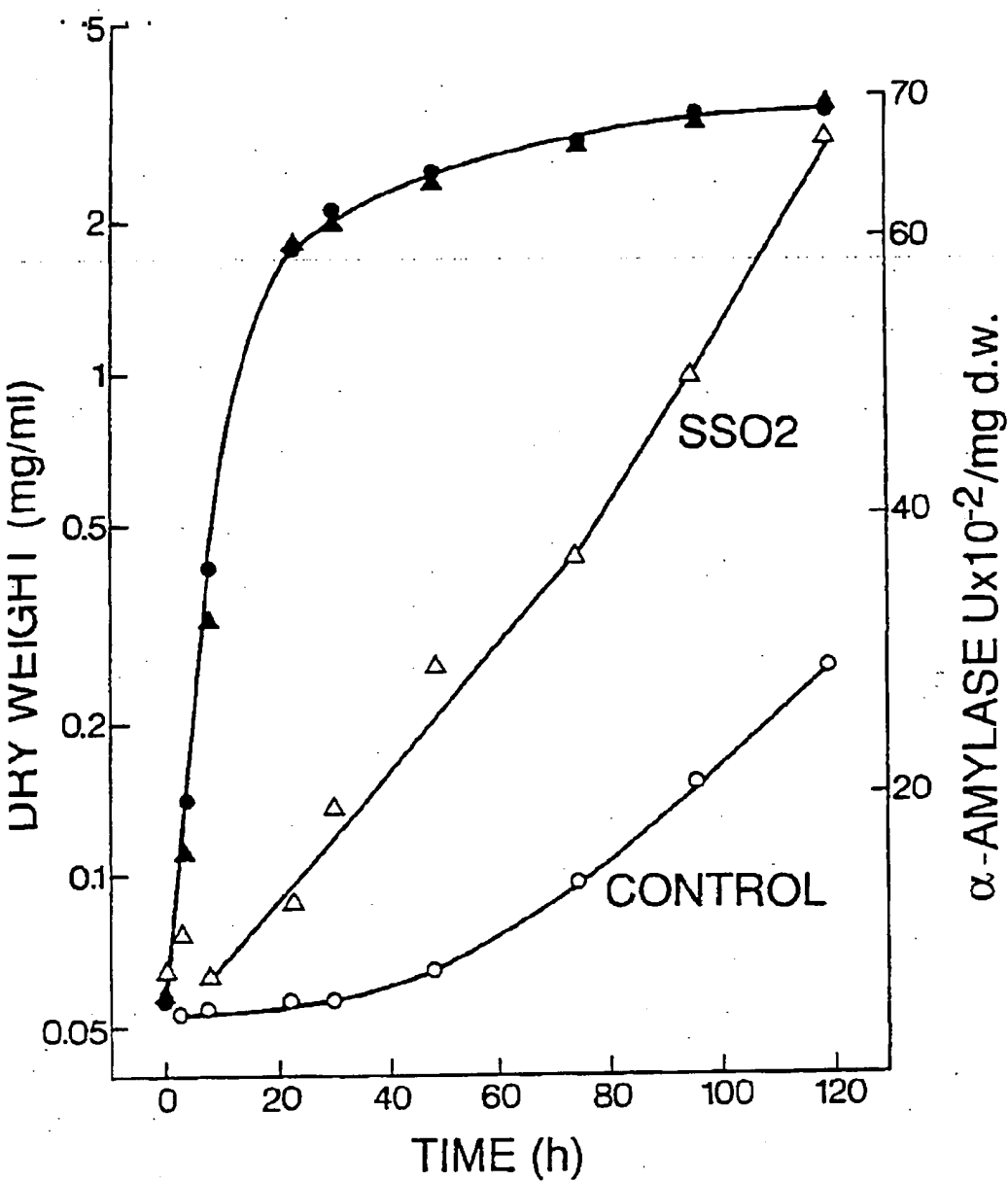


FIG. 5

[Drawing 6]

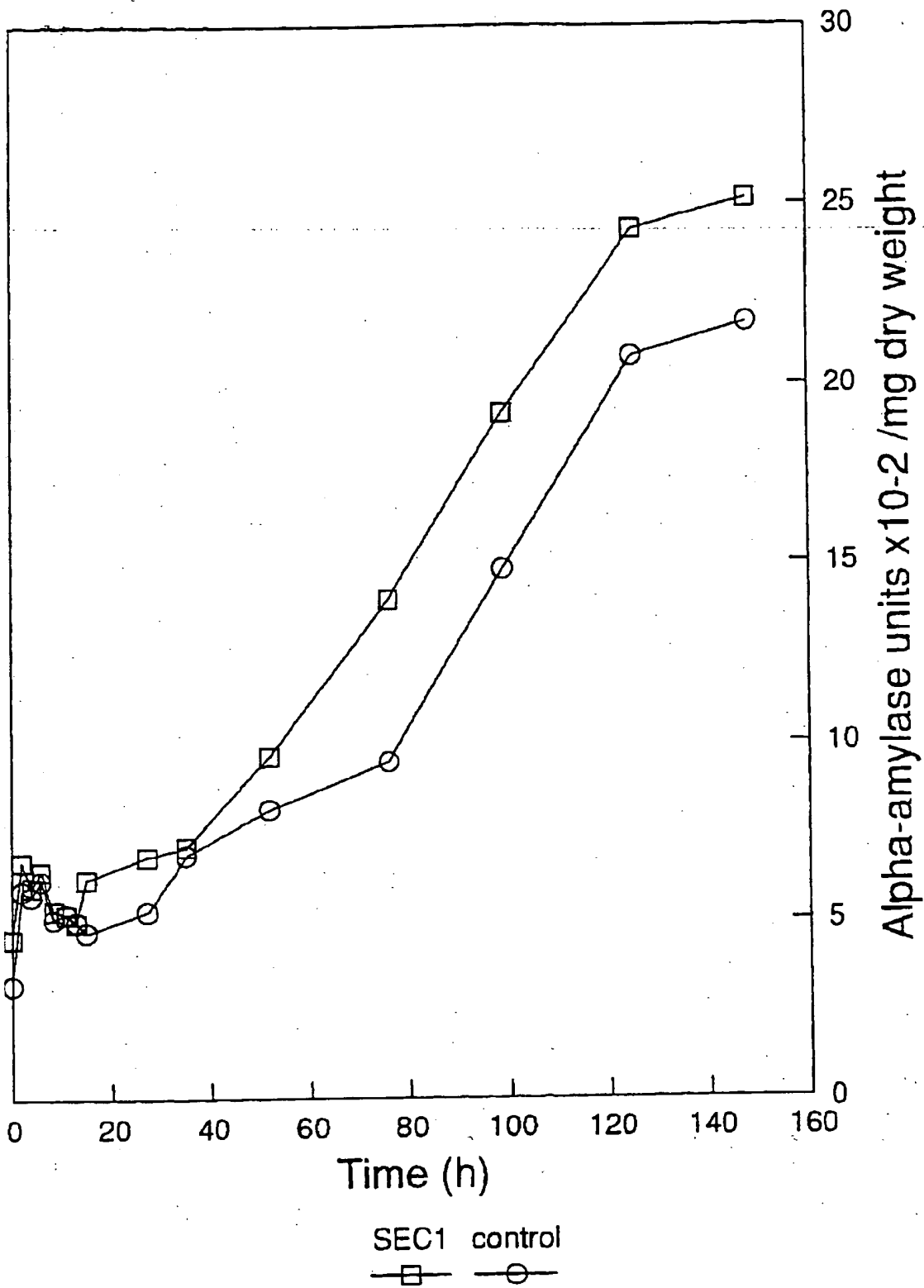


FIG. 6

[Drawing 7]

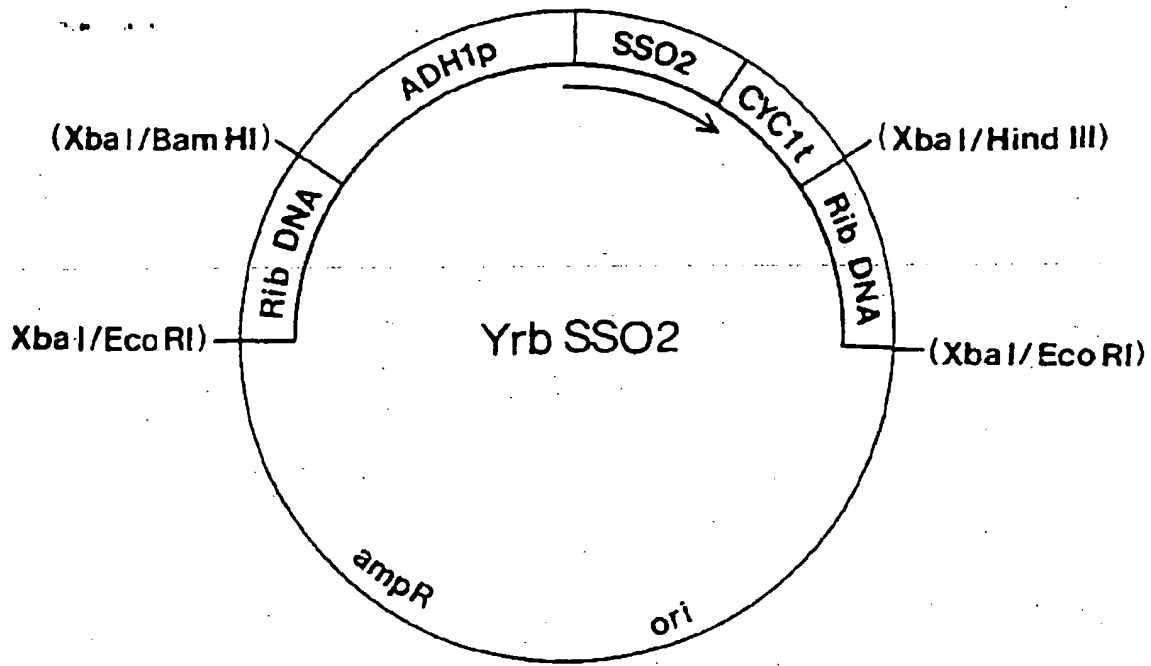


FIG. 7

[Drawing 8]



1. *Saccharomyces cerevisiae*
2. *Schizosaccharomyces pombe*
3. *Kluyveromyces lactis*
4. *Pichia stipitis*
5. *Aspergillus nidulans*
6. *Trichoderma reesei*
7. plasmid control

FIG. 8

[Translation done.]

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/09		8828-4B	
1/19			
C 1 2 P 21/02	Z N A C	9282-4B	
		9281-4B	
			C 1 2 N 15/00 A
			(C 1 2 N 15/00 A
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 66 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平6-508753	(71) 出願人	パルティオン テクニリーネン トットキ ムスケスクス
(86) (22) 出願日	平成5年(1993)10月6日		フィンランド国、エフアイエヌ-02150
(85) 翻訳文提出日	平成7年(1995)4月6日		エスポー、プオリミエヘンティエ 5
(86) 国際出願番号	P C T / F I 9 3 / 0 0 4 0 2	(72) 発明者	ケラネン、シルッカ
(87) 国際公開番号	W O 9 4 / 0 8 0 2 4		フィンランド国、エフアイエヌ-00240
(87) 国際公開日	平成6年(1994)4月14日		ヘルシンキ、ラハカマリナカトゥ 4 ビ ー 12
(31) 優先権主張番号	9 2 4 4 9 4	(72) 発明者	アールト、マルック
(32) 優先日	1992年10月6日		フィンランド国、エフアイエヌ-00380
(33) 優先権主張国	フィンランド (F I)		ヘルシンキ、ベッロンベランティエ 4
(81) 指定国	EP (A T, B E, C H, D E, D K, E S, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), A U, C A, F I, J P, N O, N Z, U S	(74) 代理人	弁理士 片桐 光治
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 組換え真核細胞による分泌タンパク質の増大された産生

(57) 【要約】

本発明は、組換えDNA技術に関する。特に、本発明は、SSO遺伝子で形質転換された、新規な組換え真核細胞に関する。数コピーのSSO遺伝子で形質転換された真核細胞、またはそれ以外の手段によりSsoタンパク質を過剰発現する真核細胞は、外来性または内在性の分泌タンパク質産生能が向上する。さらに、上記の新規な組換え細胞は、適当な加水分解酵素を発現する遺伝子で形質転換されると、適当なマクロモレキュラー化合物をより効率的に利用することができるようになる。したがって、適切な生物工学的用途において、該マクロモレキュラー化合物の、細胞による大量産生および/または多様な利用が可能になる。

【特許請求の範囲】

1. 真核細胞中で過剰発現させると、該細胞の分泌タンパク質産生量の増大を可能にする、*sec1* サプレッサー遺伝子 *SSO* の単離された DNA 配列、またはその相同配列。
2. 該 DNA 配列が真菌由来であり、真菌宿主中で過剰発現させると、該宿主の分泌タンパク質産生量の増大を可能にする請求項 1 に記載の DNA 配列。
3. 本質的に配列番号 2 および 4 で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドをそれぞれコードする *SSO1* 配列および *SSO2* 配列、並びにそれらの機能的断片から選ばれる請求項 2 に記載の DNA 配列。
4. 請求項 1～3 のいずれかに記載の DNA 配列を含むベクター。
5. それによって真核細胞を形質転換すると、その自律複製が可能である請求項 4 に記載のベクター。
6. それによって真核細胞を形質転換すると、その該細胞染色体への組込みが可能である請求項 4 に記載のベクター。
7. 該ベクターが酵母発現ベクターであり、該 DNA 配列が酵母遺伝子調節領域の制御下で発現されることを特徴とする

請求項 4 に記載のベクター。

8. 該酵母遺伝子調節領域が、*SSO1* 遺伝子、*SSO2* 遺伝子、*SEC1* 遺伝子、*GAL1*～*GAL10* 遺伝子、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 *ADH1*、アスパラギンシンセターゼ遺伝子の各プロモーター領域、並びにそれらのプロモーター領域の機能的部分からなる群から選ばれることを特徴とする請求項 7 に記載のベクター。
9. 該ベクターが糸状菌発現ベクターであり、該 DNA 配列が、糸状菌類内で機能する調節領域の制御下で発現されることを特徴とする請求項 4 に記載のベクター。
10. 上記の糸状菌類内で機能する調節領域が、*ssn*、*cbh1*、*cbh2*、*egl1*、*egl2*、*tef1*、*pgk*、*pki*、グルコアミラーゼ、 α -アミラーゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼの遺伝子の各プロモーター領域からな

る群から選ばれることを特徴とする請求項9に記載のベクター。

11. 該ベクターがYEpSSO1およびYEpSSO2からなる群から選ばれる真菌ベクターであり、その構造が図1に示される請求項4に記載のベクター。

12. 請求項1～3のいずれかに記載のDNA配列を担持し、

そしてSsoタンパク質を高レベルで発現する組換え真核細胞。

13. サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、トリコデルマ (*Trichoderma*) 属、クライベロミセス (*Kluyveromyces*) 属、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ピヒア (*Pichia*) 属、ハンゼヌラ (*Hansenula*) 属、ヤロビア (*Yarrowia*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属およびニューロスボラ (*Neurospora*) 属からなる群から選ばれる種に属する真菌細胞である請求項12に記載の組換え真核細胞。

14. サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属およびトリコデルマ (*Trichoderma*) 属から選ばれる種に属する真菌細胞である請求項13に記載の組換え真核細胞。

15. サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) VTT-C-92072株 (受託番号: DSM7253) である請求項14に記載の組換え真核細胞。

16. サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) VTT-C-92073株 (受託番号: DSM7254) である請求項14に記載の組換え真核細胞。

17. Ssoタンパク質を高レベルで発現可能な真核細胞の

構築方法にして、

(a) ドナー生物から、Ssoタンパク質をコードするDNA配列を単離し、

(b) 該DNA配列の少なくとも1つを担持するベクターを構築し、そして

(c) 得られたベクターの少なくとも1つにより宿主細胞を形質転換する

ことを包含する方法。

18. 該宿主が、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、トリコデルマ (*Trichoderma*) 属、クライベロミセス (*Kluyveromyces*) 属、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ビヒア (*Pichia*) 属、ハンゼヌラ (*Hansenula*) 属、ヤロビア (*Yarrowia*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属およびニューロスボラ (*Neurospora*) 属からなる群から選択されることを特徴とする請求項17に記載の方法。

19. 該宿主が、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属およびトリコデルマ (*Trichoderma*) 属から選ばれる種に属することを特徴とする請求項18に記載の方法。

20. S S O遺伝子を過剰発現することにより外来性または内在性の分泌タンパク質産生量を増大させる方法にして、

(a) ドナー生物から、外来性または内在性の分泌タンパク質をコードするDNA配列を単離し、

(b) 該DNA配列の少なくとも1つを担持するベクターを構築し、

(c) 得られたベクターにより、S s oタンパク質を高レベルで発現する宿主を形質転換して組換え宿主細胞を得るか、あるいは、

該ベクターにより宿主を形質転換し、この形質転換体をS S O遺伝子またはS S O遺伝子に相同な遺伝子で再度形質転換し、上記の分泌タンパク質の産生能が高められた細胞をスクリーニングし、そして

(d) 該組換え宿主細胞を、上記の分泌タンパク質の発現が可能な条件下で培養する

ことを包含する方法。

21. 正常量または増加された量のS s oタンパク質の存在下でS S O遺伝子と相互作用する遺伝子(例えば、S E C 1)を過剰発現することにより、外来性または内在性の分泌タンパク質の産生量を増大させる方法にして、

(a) ドナー生物から、外来性または内在性の分泌タンパク質をコードするDNA配列を単離し、

(b) 該DNA配列の少なくとも1つを担持するベクターを構築し、

(c) 得られたベクターにより、S s oタンパク質を正常レベルまたは高レベルで発現し、かつS S O遺伝子と相互作用するその他の遺伝子（例えば、S E C 1）を過剰発現する宿主を形質転換して組換え宿主細胞を得るか、あるいは

該ベクターにより宿主を形質転換し、この形質転換体をS S O遺伝子またはS S O遺伝子に相同な遺伝子、およびS S O遺伝子と相互作用する遺伝子（例えば、S E C 1）により再度形質転換し、上記の分泌タンパク質の産生能が高められた細胞をスクリーニングし、そして

(d) 得られる組換え宿主細胞を、上記の分泌タンパク質の発現が可能な条件下で培養する、
ことを包含する方法。

22. 内在性分泌タンパク質の産生を増大させる方法にして、

(a) 内在性分泌タンパク質を産生する細胞を、S S O遺伝子またはS S O遺伝子に相同な遺伝子単独で、あるいはS S O遺伝子と相互作用する遺伝子（例えば、S E C 1）と共同で、形質転換し、

(b) 該内在性分泌タンパク質を高レベルで産生する形質転換体をスクリーニングし、タンパク質産生能が高められた組換え細胞を得、そして

(c) 該組換え細胞を、該内在性分泌タンパク質の発現が可能な条件下で培養する、

ことを包含する方法。

23. 原料を利用して効率的にバイオマスを産生するか、または原料を効率的に加水分解する方法にして、

(a) ドナー生物から、内在性または外来性の加水分解酵素をコードするDNA配列を単離し、

(b) 該DNA配列の少なくとも1つを担持する真菌ベクターを構築し、

(c) 得られたベクターにより、S s oタンパク質を高レベルで発現する

真菌宿主を形質転換して組換え宿主細胞を得るか、あるいは、

該ベクターにより宿主を形質転換し、この形質転換体をSSO遺伝子またはSSO遺伝子に相同な遺伝子で形質転換し、上記の加水分解酵素の産生能が高められた細胞をスクリーニングし、そして

(d) 得られる組換え宿主細胞を、上記の加水分解酵素の発現が可能な条件下で培養する、
ことを包含する方法。

24. 正常量または増加された量のSsoタンパク質の存在下でSSO遺伝子と相互作用する遺伝子（例えば、SEC1）を過剰発現することにより、原料を利用して効率的にバイオマスを産生するか、または原料を効率的に加水分解する方法にして、

(a) ドナー生物から、内在性または外来性の加水分解酵素をコードするDNA配列を単離し、

(b) 該DNA配列の少なくとも1つを担持するベクターを構築し、

(c) 得られたベクターにより、正常量または増加された量のSsoタンパク質の存在下で、Ssoタンパク質と相互作用するタンパク質を高レベルで発現する宿主を形質転換して組換え宿主細胞を得るか、あるいは、

該ベクターにより宿主を形質転換し、この形質転換体をSSO遺伝子またはSSO遺伝子に相同な遺伝子、およびSSO遺伝子と相互作用する遺伝子（例えば、SEC1）により再度形質転換し、上記の加水分解酵素の産生能が高められた細胞をスクリーニングし、そして

(d) 得られる組換え宿主細胞を、上記の加水分解酵素の発現が可能な条件下で培養する、
ことを包含する方法。

【発明の詳細な説明】

組換え真核細胞による分泌タンパク質の増大された産生

技術分野

本発明は、組換えDNA技術に関する。特に、本発明は、SSO遺伝子またはその相同体で形質転換された、新規な組換え真核細胞に関する。数コピーのSSO遺伝子またはSSO遺伝子に相同な遺伝子で形質転換された真核細胞は、外来性または内在性の分泌タンパク質産生能が向上する。

さらに、上記の新規な組換え真核細胞、特に酵母類や糸状菌類は、適当な加水分解酵素を発現する遺伝子で形質転換されると、適当なマクロモレキュラー／重合化合物をより効率的に加水分解および／または利用することができるようになる。したがって、適切な生物工学的用途において、該マクロモレキュラー／重合化合物の、細胞による大量産生および／または多様な利用が可能になる。

背景技術

組換えDNA法の開発により、異種宿主系におけるタンパク質の産生が可能になった。このことにより、例えば、通常、自然界には極めて少量しか存在しない治療上重要なタンパク質、あるいは単離・精製の困難なタンパク質が、非常に容易に得られるようになった。そのようなタンパク質の例としては、成長因子、ホルモン、および従来ヒトや動物の組織、あるいは血清や尿等の体液から単離されてきたその他の生物学

的に活性なタンパク質またはペプチドが挙げられる。HBV、HIVおよび発ガン性ウイルスのようなヒト病原性ウイルスや、ヒトや動物の組織または体液中のその他の病原体の存在はますます危険なものになっているため、これらのウイルスは病原体が原因となる疾病の治療に用いるタンパク質の異種産生系の探索が非常に急がれている。臨床上重要なその他のタンパク質としては、特にイン・ビトロあるいは組織培養では生育しにくい微生物や、危険なヒト病原体である微生物、により生じる疾病の診断ワクチンの製造に必要なウイルス、その他の微生物またはヒト寄生虫のタンパク質がある。これらの微生物の具体例としては、HBV、HIV、黄熱ウイルス、風疹ウイルス、口蹄疫ウイルスおよび狂犬病ウイルス

などのウイルス、およびマラリアなどのヒト寄生虫などが挙げられる。

異種産生系が開発されている、あるいは開発されつつある他の1つのタンパク質群として、分泌酵素、特に植物性物質を加水分解する分泌酵素が挙げられる。

これらは、食品および家畜用飼料の製造だけでなく、織物工業およびパルプ・紙工業などの、その他の工業的プロセスにおいても必要なものである。異種系でのタンパク質産生または遺伝的に操作された細胞における内在性タンパク質の産生が可能になれば、その収率は向上し、純度も著しく高くなる。又この技術は、すでに今日までに、多くの重要な酵素およびその他のタンパク

質の構造や機能の研究に大きな影響を及ぼしている。例えば、酵母において外来性加水分解酵素の産生・分泌が可能になったことにより、蒸留酵母、醸造酵母、あるいはパン酵母などの工業的酵母株を用いるプロセスが改善されている。

様々な産生系が開発されており、例えば、細菌類、酵母類、糸状菌類、動・植物細胞培養物、さらにはトランスジェニック動・植物などの多細胞生物が挙げられる。これらの系は全て、欠点があるにしてもそれぞれの長所を有しており、したがって必要なものである。

酵母であるサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) は現在のところ、遺伝子レベルで最も良く知られている真核生物である。この微生物は、真核性微生物としては、真核細胞の有する長所、例えば真核生物の翻訳後に起こる修飾の、全てではないにしてもそのほとんどを有しており、一方、微生物としては、細菌の有する取り扱い易さおよび培養特性を有している。*S. セレビシエ*は、食品成分やビール、ワイン等の飲料の製造などのバイオテクノロジーにおいて、長い間有用とされてきた微生物であり、この微生物を用いる大規模な発酵システムも十分に開発されている。

酵母の遺伝子操作方法は、古典的遺伝学により得られた膨大な知識に基づき、真核生物の中でも最も進歩している。したがって、初めは大腸菌 (*Escherichia coli*) についてしか論じられなかった遺伝子工学の手法が酵母においても容易に

適用でき、しかも更に開発できるようになった。また、別の方法に従って、外来

性タンパク質を産生する酵母菌株の構築法が広く開発されている (Romanos et al., 1992)。

タンパク質を培養培地に分泌させるには、分泌経路を構成している様々な膜閉鎖系区画を経由して該タンパク質を運搬する。まず最初に、タンパク質は小胞体 (ER) の内腔へと移動する。該タンパク質は、そこから、膜小胞に運搬されてゴルジ複合体へと移動し、さらにゴルジ複合体から形質膜へと移動する。この分泌プロセスはいくつかの工程からなり、分泌タンパク質を含有する小胞が、ドナーの膜から発芽して、受容体の膜を標的として融合する。これらの各工程においては、いくつかの異なるタンパク質の作用が必要となる。

酵母の分泌経路およびそれに関与する非常に多くの遺伝子は、その分泌プロセスのある特定の工程に欠陥のある条件致死変異株を単離することにより明らかにされている (Novick et al., 1980; 1981)。ある特定の運搬工程に必要とされるタンパク質の突然変異により、分泌されたタンパク質がその工程前の膜区画に蓄積する。このようにして、タンパク質はER、ゴルジ複合体、ERとゴルジ複合体との間の小胞、あるいはゴルジ複合体と形質膜との間の小胞に蓄積できる。

分泌プロセスに関与する遺伝子およびタンパク質は、該遺伝子のクローニングやそれに対応するタンパク質の機能の特徴づけにより、さらに詳細に解析できるようになった。全て

の工程において、相互作用するいくつかのタンパク質が機能していることが明らかになった。近年、我々は、高温において生育やタンパク質の分泌を損なう sec 1-1 の多コピーサプレッサーとして、2つの新規な酵母遺伝子である SSO1 および SSO2 をクローニングした (Aalto et al., 1993)。

S. セレビシエに関して同定・単離された遺伝子が多く発見され、酵母遺伝子との配列相同性あるいは酵母突然変異の相補性に基いて他の生物からクローニングされている。哺乳動物の NSF 因子は酵母の SEC18 遺伝子産生物の相同体であり、タンパク質分泌において同様の機能を示す (Wilson et al., 1989)。

また、ヤロビア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) の SEC14 遺伝子 (Lopez et al., 1992) がクローニングされ、特徴づけられている。シグナルペプチ

ダーゼの成分をコードする酵母 *SEC11* 遺伝子に対する哺乳動物の相同体がクローニングされている (Greenberg et al., 1989)。小さな GTP 結合タンパク質をコードするシゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) *YPT1* 遺伝子は、酵母 *SEC4* 遺伝子をプローブとして用いてクローニングされ (Fawell et al., 1989)、この *YPT1* 遺伝子に対応する哺乳動物の遺伝子は、酵母 *Ypt1* タンパク質に対する抗体を用いて、分泌機構の一部であることが証明された (Segev et al., 1988)。*Ypt1* タンパク質に相同であることが証明された哺乳動物 *rab1* タンパク質

(Zaraoui et al., 1989) は、酵母 *Ypt1* タンパク質の機能と同じ役割を果たす (Haubruck et al., 1990)。

本発明による酵母 *SSO1* 遺伝子および *SSO2* 遺伝子とタンパク質レベルにおいて相同な遺伝子が、例えばマウス (Hirai et al., 1992)、ラット (Inoue et al., 1992; Bennett et al., 1992) および線虫 (Ainscough et al., 1991; EMBL Data Bank 29, 受託番号: M 75825) などのいくつかの種で発見されており、したがって、これらの遺伝子が進化の過程において保持されていることが分かる。その他の種においても、そのような相同タンパク質は細胞表面に見出され、あるいは細胞表面へのシナプス小胞輸送に関与していると考えられており、*SSO1* 遺伝子および *SSO2* 遺伝子と機能的に関連することが示唆されている。しかしながら、分泌に直接関与することは、*Sso* タンパク質についてのみ証明されているだけであり、しかもそれは我々が報告したものである (Aalto et al., 1993)。酵母が有する、シナプス小胞膜タンパク質、即ちシナプトブレビン類 (synaptobrevins) に対する相同体は *Snc1* および *Snc2* タンパク質である (Gerst et al., 1992; Protopopov et al., 1993)。

上記の例 (更に多くの例も報告されている) は、分泌機構の普遍性を示している。従って、酵母について得られる結果は、その他の真菌類、さらにはその他の真核細胞にもほとんど

どあてはまる。

S S O遺伝子に類似する配列を有する遺伝子は、細胞内タンパク質の輸送／分泌の上記以外の他の工程にも関与している。例えば、S E D 5 遺伝子 (Hardwick and Pelham, 1992) は E R とゴルジ複合体の間、および P E P 1 2 遺伝子 (Becherer and Jones, 1992) はゴルジ複合体と液胞 (酵母のリソソーム区画) の間のタンパク質の輸送／分泌に関与している。このことは、S S O 遺伝子が、タンパク質の分泌および細胞内輸送において中心的かつ保持された役割を有することがさらに支持される。しかしながら、酵母または動物細胞において S S O 遺伝子相同体が過剰発現された場合に、タンパク質の分泌に関して、本発明で我々が S S O 遺伝子について示すような有利な効果を生じることについての報告は全くない。

クライベロミセス (*Kluyveromyces*)、ピヒア (*Pichia*)、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) およびハンゼヌラ (*Hansenula*) などの、上記以外の酵母類の分泌システムについてはあまり知られていない。しかし、これらの酵母類は、外来性タンパク質産生の宿主として有用であることがわかっている (Buckholz and Gleeson, 1991)。これらの酵母類は遺伝学的および分子生物学的にサッカロミセスほどには解明されていないが、産生宿主としてはサッカロミセスと同等に有用である。このことは、従来外来性分泌タンパク質の産生に用いられてきたニューロスボラ (*Neurospora*) 属、

アスペルギルス (*Aspergillus*) 属およびトリコデルマ (*Trichoderma*) 属などの糸状菌類についても言えることである (Jeenes et al., 1991)。非常に多くの糸状菌類は、S. セレビシエのように、分類学上真菌類に属し、さらに子嚢菌類に属するので、分泌機構が S. セレビシエと類似していることは明らかである。糸状菌類は自己の加水分解酵素は非常に効率的に分泌する。しかし、糸状菌類における外来性タンパク質の産生はそれ程効率的ではない。これは、多くの場合、分泌が不十分なためと考えられる。全ての菌類に共通する特徴は、例えば、分泌経路に沿って起こる翻訳後修飾である。

これまでに、酵母や糸状菌類、さらにはその他の生物における外来性タンパク質の産生を高めるために、いくつかの試みがなされ、発表されてきた。また、転

写レベルを高くするかあるいはプラスミドのコピー数を増加させるための、様々なプロモーターおよびプラスミドの構築に多くの労力が費されてきた（例えば、Baldari et al., 1987; Martegani et al., 1992; Irani and Kilgore, 1988 を参照）。分泌を増大させるための一般的なアプローチは、酵母のシグナル配列を用いることである（Baldari, et al., 1987; Vanoni et al., 1989）。酵母および糸状菌類においては、外来性タンパク質をさらに効率的に分泌させるために、分泌タンパク質のランダムな突然変異誘発および突然変異株のスクリーニング（Smith et al., 1985; Sakai et al., 1988; Schuster et al., 1989; Suzuki et al., 1989; Sleep et al., 1991; Lamsa and Bloebaum, 1990; Dunn-Coleman et al., 1991）、あるいは外来性タンパク質の、効率的に分泌された内在性タンパク質への融合（Ward et al., 1990; Harkki et al.,

1989; Nyysönen et al. 1993; Nyysönen et al., 特許出

願）が広く用いられている。しかし、これらの方法には限界がある。ランダムな突然変異誘発を施し、スクリーニングすることにより単離される分泌タンパク質過剰産生突然変異株は、専ら劣性形質であるため、倍数体である工業用酵母株としては用いられない。この過剰産生は、しばしば、分泌の増大以外の変化により引き起こされ、多くの場合、スクリーニングに用いられるタンパク質だけに影響を及ぼす。一方、融合タンパク質によるアプローチでは、各外来性タンパク質の融合構造をそれぞれ調整することが必要である。

我々のアプローチでは、分泌において機能する遺伝子のコピー数を増加させ、分泌機構の構成成分の量がより普遍的なものになる。従って、特殊な融合構造をもたないタンパク質であれば応用でき、また、二倍体や倍数体の株にも応用可能である。

分泌プロセスにおいて、どの工程がボトルネックとなるのかについては正確には知られていないが、そのような工程は複数であることが予想できる。我々は、分泌経路の最終段階において起こりうる障害の解明を始めた。そして、ゴルジ複

合体から出芽する分泌小胞が形質膜を標的とし、それと融合して分泌タンパク質を細胞外に放出する段階である、分泌プロセスの最終段階に関与する遺伝子をクローニングし、特徴づけを行なった。我々は、先に、この段階において機能するSEC1遺伝子をクローニングし、特徴づけを行なった (Aalto et al., 1991; Aalto et al., 1992)。その後、このSEC1遺伝子が、必須の単コピー遺伝子であることを示した (Aalto et al., 1993)。また、本発明によるSSO遺伝子は、sec1-1突然変異の多コピーサプレッサーとしてクローニングされた (Aalto et al., 1993)。

発明の概要

本発明は、過剰発現させると分泌タンパク質の産生が増大する遺伝子の単離について記載する。特に、本発明は、Sso1タンパク質およびSso2タンパク質をそれぞれコードするS. セレビシエのSSO1遺伝子及びSSO2遺伝子の単離、該遺伝子の特徴づけ、該遺伝子のS. セレビシエへの導入並びにそこにおける過剰発現について記載する。さらに、本発明は、トリコデルマ・レーセイ (Trichoderma reesei) からのSSO相同遺伝子の単離、該遺伝子の特徴づけおよびトリコデルマへの導入およびそこにおける過剰発現について記載する。

さらに、酵母のSSO遺伝子群と高等真核細胞の対応する遺伝子群との配列相同性により、本発明は、高められた分泌

能を有する、より高等な真核生物の新規な細胞株の構築に用い得ることが示される。

したがって、本発明は、新規な組換え真核細胞、好ましくは、Ssoタンパク質を高レベルで発現する真菌宿主細胞、特にSso1タンパク質および/またはSso2タンパク質を高レベルで発現する酵母株、およびトリコデルマSsoタンパク質を高レベルで発現するトリコデルマ株を提供するものである。また、本発明は、SEC1遺伝子のようにSSO遺伝子と相互作用する遺伝子を過剰発現することにより、分泌タンパク質の産生を増大する方法を提供する。

本発明による、SSO遺伝子またはSSO遺伝子と相互作用する遺伝子により形質転換される真核細胞は、分泌タンパク質産生能が向上する。また、本発明に

よる新規な真核細胞、特に酵母および糸状菌類は、さらに効率的な加水分解酵素の産生および重合性物質等の加水分解に用いられる。このような菌類を用いれば、細胞量の増加による単一細胞またはビール酵母産生のような生物工学的なプロセス、あるいは加水分解酵素の効率的な産生および／または植物性材料の効率的な加水分解が有益とされるその他のプロセスが改善される。

図面の簡単な説明

図1は、多コピープラスミドpMAC561に、S. セレビシエSSO1遺伝子およびSSO2遺伝子のcDNAをそれぞれ組み込んで得られるプラスミドYE pSSO1および

YE pSSO2を示す。

図2は、YE pSSO2により形質転換された酵母におけるSso2タンパク質の過剰発現を証明するウェスタンブロット解析を示す。

図3は、SSO1遺伝子またはSSO2遺伝子を発現する多コピープラスミド、およびバチルス(Bacillus) α -アミラーゼ遺伝子を発現する別のプラスミドにより形質転換したS. セレビシエ(sf750-14D株)により分泌されたバチルス α -アミラーゼ産生量の増大を示すグラフである。

図4は、SSO1遺伝子またはSSO2遺伝子を発現する多コピープラスミドを有する、あるいは有さないS. セレビシエにより分泌されたバチルス α -アミラーゼのウェスタン解析を示すものである。

図5は、SSO2遺伝子を発現する多コピープラスミド、およびバチルス α -アミラーゼを発現する別のプラスミドにより形質転換したS. セレビシエ(DBY746株)により分泌されたバチルス α -アミラーゼ産生量の増大を示すグラフである。

図6は、SEC1遺伝子を発現する多コピープラスミド、およびバチルス α -アミラーゼを発現する別のプラスミドにより形質転換したS. セレビシエ(DBY746株)により分泌されたバチルス α -アミラーゼ産生量の増大を示すグラフである。

図7は、リボゾーム配列により両側からはさまれたSSO2発現カセットをBS+ベクターに組み込んで得られるプラスミドpRbSSO2を示す。

図8は、6種類の異なる真菌種に由来するDNAと、酵母SSO1遺伝子とのハイブリダイゼーションを示す。

発明の詳細な説明

以下の本発明の詳細な説明がよりよく理解されるように、以下で用いる特定の用語について定義する。

遺伝子の過剰発現：

前記遺伝子によりコードされるタンパク質の細胞内における産生量は増大する。これは、多コピー数の該遺伝子をプラスミドにのせて細胞に導入するか、あるいはゲノムに組込んで、該遺伝子のコピー数を増加させることにより達成できる。また、過剰発現は、該遺伝子を、それ自身のプロモーターよりも強力なプロモーターの制御下に配置することによっても達成できる。細胞中の該タンパク質の量は、遺伝子のコピー数および／または発現に用いられるプロモーターの強度を様々に変えることにより調節できる。

突然変異の抑圧：

ある特定の遺伝子（第1の遺伝子）の突然変異の効果が他の遺伝子（第2の遺伝子）の突然変異により低下または完全に損なわれた場合、この第2の遺伝子は第1の遺伝子のサプレッサーと呼ばれる。抑圧（サプレッション）は、上記の方

法による第2の遺伝子の野生型対立遺伝子の過剰発現によっても起り得る。これは、過剰発現抑圧と呼ばれる。過剰発現が多コピー数の抑圧遺伝子により引き起こされる場合には、多コピー抑圧とも呼ばれる。抑圧現象の発生は、これら2つの遺伝子が遺伝子レベルで相互作用していることを示す。この相互作用は、これら2つの遺伝子がコードする2つのタンパク質間の、直接的且つ物理的な接触として、物理的レベルでも起こる。

相同遺伝子、相同体：

DNA配列において関連はあるが同一ではなく、及び／または同じ機能を有する遺伝子は、互いに相同であり、又、互いに相同体であると呼ばれる。

分泌タンパク質：

分泌経路が細胞内部にあり、その経路を通じて細胞外（形質膜の外側）へと輸送されるタンパク質を、分泌タンパク質と呼ぶ。酵母において、このタンパク質は、例えばインベルターゼのように細胞壁と結合したままであるか、あるいは外来性タンパク質バチルス α -アミラーゼのように細胞壁を通じて生育培地へ放出さる。

本発明で用いられるSSO1遺伝子およびSSO2遺伝子は、これらの遺伝子を含む生物、例えばサッカロミセスセレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) やトリコデルマ (*Trichoderma*) 属から単離される。また、それ以外の好適

な酵母およびその他の真菌類として、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、クライベロミセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*)、ピヒア (*Pichia*) 属、ハンゼヌラ (*Hansenula*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、ニューロスポラ (*Neurospora*) 属、およびペニシリウム (*Penicillium*) 属等が挙げられる。その他の生物から単離される相同遺伝子も用い得ることも注目すべきである。

さらに、同工程において、SEC1遺伝子のように、SSO遺伝子と共同で機能するその他の遺伝子を、正常レベルまたは増加されたレベルのSsoタンパク質の存在下で過剰発現することにより、分泌を高めることができる。分泌プロセスの前の工程で機能する遺伝子もおそらく同様の効果を有すると考えられる。したがって、ゴルジ区画からの分泌小胞の遊離は、この遊離工程で機能することが知られているSEC7遺伝子および／またはSEC14遺伝子のコピー数を増加させること (Novick et al., 1980)、もしくはSEC7遺伝子および／またはSEC14遺伝子と相互作用する遺伝子（例えばこれらの突然変異のサプレッサー）を探索し、そのコピー数を増加させることにより促進される。同様に、分泌プロセスのいずれの前工程も、関与する遺伝子のコピー数を増加させることにより改良することが可能である。我々がS. セレビシエから単離した新規な遺伝子であるSSO1およびSSO2は、細胞内で重要な役割を果たすことが示唆される

重複遺伝子の代表的なものである。上記したように、SSO1遺伝子およびSSO2遺伝子の性質やそれらの相同性が他の種の中において保持されることに基いて、我々は、あらゆる他の真核生物種においてSSO遺伝子を増加させれば、その他の酵母類、糸状菌類および動植物細胞等におけるタンパク質分泌効率が高まることを提案する。

多くの遺伝子その他の生物における分泌に関与していた、という事実により、本発明は、例えば、分泌を促進させるための、糸状菌類および高等真核生物内における酵母遺伝子の発現、およびその逆（すなわち、酵母内での糸状菌および高等真核生物の遺伝子の発現）あるいは、真核生物の遺伝子の別の真核生物内における発現をも包含することに注目されたい。

本発明の遺伝子により形質転換される宿主としては、外来性または内在性タンパク質の産生に好適な真核細胞であれば、いかなるものであってもよく、例えば、*S. セレビシエ*酵母株（DBY746、AH22、S15O-2B、GPY55-15B α 、VTT-A-631015等）、トリコデルマ属〔天然単離体であるQM6a（RUTC-30、QM9416、VTT-D-79125等）に由来する*T. ハルジアナム*（*T. harzianum*）および*T. レーセイ*（*T. reesei*）株〕、*クライベロミセス*属、*Sch. ポンベ*、*H. ポリモルファ*（*H. polymorpha*）、*ピヒア*属、*アスペルギルス*属、*ニューロスポラ*属、*ヤロビア*属、*ペニシリウム*属、あるいはさらに高等な真核細胞が挙げられる。該遺伝子のこれらの宿主への移入は、例えば、これらの生物について記載されている従来の方法を用いて達成できる。

SSO1遺伝子またはSSO2遺伝子を含有するDNA配列は、*S. セレビシエ*から従来の方法により単離される。1つの好ましい態様において、多コピープラスミド上の遺伝子またはcDNAライブラリーは、*sec1-1*突然変異株の温度感受性の抑圧（Aalto et al., 1991; 1993）、あるいは*S. セレビシエ*SSO遺伝子の機能を欠失させる突然変異またはその他の種のアナログ突然変異の抑圧に用いられる。もうひとつのアプローチとして、SSO遺伝子およびSSO遺伝子に類似する遺伝子の既知のDNA配列を、異種ハイブリ

ダイゼーションに用いるプローブ、あるいはSSO遺伝子のクローニングに用いるPCRプライマーの設計に用いる。さらにもうひとつのアプローチとして、既知のSSO遺伝子およびSSO遺伝子に類似する遺伝子に対する抗体を、常法による該遺伝子のクローニングに用いる。

S. セレビシエのSSO1遺伝子およびSSO2遺伝子に相当する遺伝子は、以下に記載する方法の1つまたはいくつかを用いて、それ以外の真菌類や高等真核生物からも単離される。その方法は、ここでは糸状菌であるトリコデルマ・レーセイからの単離について特に記載するものであるが、従来知識および手段に従って当該の真核細胞に合わせて改変することができる。

T. レーセイのcDNAバンクは、フィンランド国特許出願第92-2373号 (Buchert et al.) 明細書に記載されているように、酵母ベクターpFL60に構築される。この遺伝子バンクDNAはS. セレビシエH458株に挿入されて該株を形質転換し (Aalto et al., 1993)、例えば実施例6に記載されているような分泌欠損の相補性によりスクリーニングする。このプラスミドを陽性コロニーから単離し、該遺伝子を常法により単離・特徴づける。そして、該相当染色体遺伝子を単離する。十分な相補性は、酵母SSO遺伝子と機能的に同じ遺伝子が、他の真菌類、例えばT. レーセイにも存在することを示す。

あるいは、S. セレビシエのSso1タンパク質および/またはSso2タンパク質に対応するタンパク質をコードする遺伝子は、実施例7に記載されているような比較的厳しくない条件下での異種ハイブリダイゼーションによりT. レーセイから調製されるcDNAまたは染色体遺伝子バンクから単離し、通常の方法により特徴づけることができる。該遺伝子の機能も、上記したような方法により調べることができる。酵母SSO遺伝子に相同な染色体配列を有すること (例えば、DNA全体のサザンブロット・ハイブリダイゼーションにより解析される) が証明されている全ての生物についても、同様のアプローチが好適に用いられる。また、該遺伝子は、酵母Ssoタンパク質に対して調製した抗体を用いて、発現ライブラリーから単離することもできる。

一方、オリゴヌクレオチドプライマーは、数種の生物から単離された各対応遺

伝子間において発見される相同性に基いて設計できる。明確な相同性は、例えば、S s o 1タンパク質（配列番号1）の第266番～第287番のアミノ酸領域およびS s o 2タンパク質（配列番号3）の第269番～第290番のアミノ酸領域において認められる。これらのプライマーは、T. レーセイ遺伝子のPCRにおける増幅に用いられる。

酵母の形質転換に好適なプラスミドを構築するために、S S O 1遺伝子またはS S O 2遺伝子を、適当な酵母発現ベク

ター〔例えば、p A A H 5（Ammerer, 1983）など〕、または適当な酵母の調節領域を含有する、酵母発現ベクターから誘導されるベクター（Ruohonen et al., 1991; Ruohonen et al., manuscript in preparation, a）にクローニングされる。これらの調節領域は、例えば、ADH1、GAL1～GAL10、PGK1、CUP1、GAP、CYC1、PHO5等の酵母遺伝子、あるいはアスパラギンシンセターゼ遺伝子から得ることができる。また、S S O 1遺伝子またはS S O 2遺伝子の調節領域も、該遺伝子のS. セレビシエ内での発現に用いられる。S S O 1遺伝子またはS S O 2遺伝子を担持しているプラスミドによって、受容菌である酵母株を軽質転換すると、自律複製が可能である（The plasmid carrying the SS01 or SS02 gene is capable of replicating autonomously when transformed into the recipient yeast strain）。S S O 1遺伝子またはS S O 2遺伝子は、適当な酵母調節領域と共に、Hans Ronne のp H R 7 0、あるいはp R S 3 1 3、p R S 3 1 4、p R S 3 1 5またはp R S 3 1 6（Sikorski and Hieter, 1989）などの単コピー酵母ベクターにクローニングされる。

また、多コピー数のS S O 1遺伝子またはS S O 2遺伝子を酵母染色体、例えばリボゾームRNA座に組込むことも可能である。この組込みを起こすためには、好適なプラスミド〔例えば、プラスミドp I R L 9（Hallborn et al., 特許

出願）など〕のリボゾーム配列を分離し、図7に示すようにB S +ベクターに適当にクローニングする。好適な酵母プロモーターおよびターミネーター領域の間に連結されたS S O 1遺伝子またはS S O 2遺伝子は、該遺伝子を含有するハイ

ブリッド・ベクターから分離し、前の工程で得られたプラスミドにクローニングする。こうして得られたプラスミドから、リボゾーム配列で両側からはさまれた発現カセットを分離する。この断片は、形質転換に好適なマーカーを担持している自律複製プラスミドと共に、酵母へ組み込まれ、該酵母を形質転換する。このプラスミドは、軽質転換後に、染色体に組込まれた多コピー数のSSO1遺伝子またはSSO2遺伝子を含有する細胞から、該細胞を非選択的条件下で培養することにより除去することができる。このようにして、細菌ベクター配列などの余分の外来性DNAを全く担持していない組換え菌株が得られる。倍数体酵母株（例えば、VTT-A-63015など）が用いられる場合、該遺伝子を、ADH1座またはpGK1座のように必須な遺伝子座にも組込むことができる。

SSO遺伝子をトリコデルマ内で発現させるためには、トリコデルマsso遺伝子のコード領域を、例えばT.レーセイcbh1プロモーターおよびターミネーターの間に連結し、得られた発現カセットを、例えば哺乳動物抗体やその他の外来性タンパク質を産生するトリコデルマ株、あるいはEGI

コア、別のセルラーゼまたは加水分解酵素を産生する菌株に組み込んでこれを形質転換する。分泌の促進は、その菌がグルコース含有培地上で生育される場合に特に望まれることであり、このためには、sso遺伝子は構成プロモーターまたはグルコース培地上で機能するプロモーターから発現されなければならない。

糸状菌類において、sso遺伝子は、好ましくは当技術分野で公知の方法を用いてゲノムに組込まれる。cbh1プロモーターやsso遺伝子自身のプロモーター以外の好適なプロモーターとしては、例えば、その他のセルラーゼプロモーター、cbh2、egl1、egl2、またはtef1、pgk、gpd、pki、グルコアミラーゼ、 α -アミラーゼまたはアルコールデヒドロゲナーゼなどのプロモーターが挙げられる。糸状菌類において、sso遺伝子による形質転換を行なうと、通常は、ゲノムに組込まれた様々なコピー数の

sso遺伝子含有菌株が得られ（Penttilä et al., 1987）、

これらの菌株から、生育に最適なレベルのsso発現能および高められた分泌能を有する菌株をスクリーニングすることができる。

したがって、本発明の目的は、S. セレビシエのSSO遺伝子、特にSSO1遺伝子およびSSO2遺伝子、さらにはそれらの遺伝子に対するトリコデルマ・レーセイおよびその他の真核細胞の相同遺伝子を提供することである。これらの

遺伝子の配列は、それらを担持するプラスミドから、例えば二本鎖ジデオキシヌクレオチド配列決定法 (Zagursky et al., 1986) により決定することができる。S. セレビシエのSSO1遺伝子の配列を配列番号1に示し、SSO2遺伝子の配列を配列番号3に示す。

本発明の他の1つの目的は、SSO遺伝子を含有する特定のベクターを提供することである。酵母に対するそのようなベクターは、上記したように、自律的に複製する多コピーまたは単コピープラスミド、或いは染色体に組込み可能なベクターのいずれかである。一方、トリコデルマに対するそのようなベクターは、好ましくは、制限酵素により発現カセット（プロモーター-遺伝子-ターミネーター）が分離出来、真菌ゲノムに組込まれるようなプラスミドである。

本発明のさらに他の1つの目的は、複製プラスミド上に、あるいは染色体に組込まれた形で多コピー数のSSO遺伝子を含有する酵母株、その他の真菌株および真核細胞系を提供することである。そのように多コピー数のSSO遺伝子を含有する酵母株、真菌株、真核細胞系は、例えば、酵母インベルターゼ、トリコデルマセルラーゼまたはその他の加水分解酵素等の分泌タンパク質の産生能が高められる。

したがって、Ssoタンパク質を高レベルで発現可能な新規な真核細胞の構築方法にして、

(a) 適当なドナー生物から、Ssoタンパク質をコ

ードするDNA配列を単離し、

(b) 該DNA配列の少なくとも1つを担持するベクターを構築し、そして

(c) 得られたベクターの少なくとも1つにより適当な宿主細胞を形質転換する、

ことを包含する方法が提供される。

本発明のさらに他の1つの目的は、多コピー数のSSO遺伝子に加えて、さらに α -アミラーゼ、セルラーゼまたは抗体等の外来性または内在性の分泌タンパク質をコードするDNA配列を含有し、該分泌タンパク質を発現可能な真核細胞を提供することである。

したがって、SSO遺伝子を過剰発現させることにより外来性または内在性の分泌タンパク質産生量を増大させる方法が提供される。この方法は、

(a) 適当なドナー生物から、外来性または内在性の分泌タンパク質をコードするDNA配列を単離し、

(b) 該DNA配列の少なくとも1つを担持するベクターを構築し、

(c) 得られたベクターにより、Ssoタンパク質を高レベルで発現する適当な宿主を形質転換して組換え宿主細胞を得るか、あるいは、

該ベクターにより適当な宿主を形質転換し、この形質転換体をSSO遺伝子またはSSO遺伝子に相同な遺

伝子で再度形質転換し、上記の分泌タンパク質の産生能が高められた細胞をスクリーニングし、そして

(d) 該組換え宿主細胞を、上記の分泌タンパク質の発現が可能な条件下で培養することを含む。

本発明のさらに他の1つの目的は、Ssoタンパク質レベルを、異なるプロモーターおよび異なるコピー数の遺伝子を用いて最適化すること、およびSSO遺伝子を分泌に関与するその他の遺伝子（例えば、SEC1など）と組み合わせることにより、分泌能を向上させることである。

したがって、本発明は、正常量または増加された量のSsoタンパク質の存在下でSSO遺伝子と相互作用する遺伝子（例えば、SEC1）を過剰発現することにより、外来性または内在性の分泌タンパク質の産生量を増大させる方法にして、

(a) 適当なドナー生物から、外来性または内在性の分泌タンパク質をコ

ードするDNA配列を単離し、

(b) 該DNA配列の少なくとも1つを担持するベクターを構築し、

(c) 得られたベクターにより、SSOタンパク質を正常レベルまたは高レベルで発現し、かつSSO遺伝子と相互作用するその他の遺伝子（例えば、SEC1）を過剰発現する適当な宿主を形質転換して組換え宿主細胞を得るか、あるいは、

該ベクターにより適当な宿主を形質転換し、この形質転換体をSSO遺伝子またはSSO遺伝子に相同な遺伝子、およびSSO遺伝子と相互作用する遺伝子（例えば、SEC1）により再度形質転換し、上記の分泌タンパク質の産生能が高められた細胞をスクリーニングし、そして

(d) 得られる組換え宿主細胞を、上記の分泌タンパク質の発現が可能な条件下で培養する、

ことを包含する方法を提供する。

本発明のさらに他の1つの目的は、内在性分泌タンパク質の産生を増大させる方法にして、

(a) 内在性分泌タンパク質を産生する細胞を、SSO遺伝子またはSSO遺伝子に相同な遺伝子単独で、あるいはSSO遺伝子と相互作用する遺伝子（例えば、SEC1）と共同で、形質転換し、

(b) 該内在性分泌タンパク質を高レベルで産生する形質転換体をスクリーニングし、タンパク質産生能が高められた組換え細胞を得、そして

(c) 該組換え細胞を、該内在性分泌タンパク質の発現が可能な条件下で培養する、

ことを包含する方法を提供することである。

本発明のさらに他の1つの目的は、多コピー数のSSO遺伝子またはその相同体に加えて、さらに加水分解酵素（例え

ば、 α -アミラーゼおよび／またはグルコアミラーゼ）またはリグノセルロース加水分解酵素（例えば、セルラーゼ、ヘミセルラーゼまたはリグニナーゼ）をコ

ードするDNA配列を含有する真菌株を提供することである。このような真菌株は、デンプンやリグノセルロース等の重合化合物の加水分解能が向上、及び／または該重合化合物上での生育が促進される。

したがって、原料を利用して効率的にバイオマスを産生するか、または原料を効率的に加水分解する方法が提供される。

この方法は、

(a) 適当なドナー生物から、内在性または外来性の加水分解酵素をコードするDNA配列を単離し、

(b) 該DNA配列の少なくとも1つを担持する真菌ベクターを構築し、

(c) 得られたベクターにより、S s oタンパク質を高レベルで発現する適当な真菌宿主を形質転換して組換え宿主細胞を得るか、あるいは、

該ベクターにより適当な宿主を形質転換し、この形質転換体をS S O遺伝子またはS S O遺伝子に相同な遺伝子で形質転換し、上記の加水分解酵素の産生能が高められた細胞をスクリーニングし、そして

(d) 得られる組換え宿主細胞を、上記の加水分解酵素の発現が可能な条件下で培養する、

ことを包含する。

又、更に、正常量または増加された量のS s oタンパク質の存在下でS S O遺伝子と相互作用する遺伝子（例えば、S E C 1）を過剰発現することにより、原料を利用して効率的にバイオマスを産生するか、または原料を効率的に加水分解する方法にして、

(a) 適当なドナー生物から、内在性または外来性の加水分解酵素をコードするDNA配列を単離し、

(b) 該DNA配列の少なくとも1つを担持するベクターを構築し、

(c) 得られたベクターにより、正常量または増加された量のS s oタンパク質の存在下で、S s oタンパク質と相互作用するタンパク質を高レベルで発現する適当な宿主を形質転換して組換え宿主細胞を得るか、あるいは、

該ベクターにより適当な宿主を形質転換し、この形質転換体をS S

O遺伝子またはSSO遺伝子に相同な遺伝子、およびSSO遺伝子と相互作用する遺伝子（例えば、SEC1）により再度形質転換し、上記の加水分解酵素の産生能が高められた細胞をスクリーニングし、そして

（d）得られる組換え宿主細胞を、上記の加水分解酵素の発現が可能な条件下で培養する、
ことを包含する方法が提供される。

上記の組換え細胞は、単一細胞による産生、アルコール産

生の改良、あるいは原料の効率的な加水分解が望まれるプロセスに利用することができる。

実施例

実施例1：サッカロミセス・セレビシエ由来のSSO1遺伝子およびSSO2遺伝子の各コード領域のクローニング

SSO1遺伝子およびSSO2遺伝子は、温度感受性欠損sec1-1突然変異株（Novick and Scheckman; 1979; Novick et al., 1980）のサブプレッサーとして単離した。S. セレビシエ sf750-14D α 株（ α sec1-1 his4 ura3-52 trp1-289 leu2-3 leu2-112）（ランディ・シェックマン（Randy Scheckman），University of California, Berkeley, CA より入手）を、X2180-1B株由来のcDNAを2 μ 塩基プラスミド（pMAC561；選択マーカーとしてTRP1を含有）に導入して構築された酵母cDNAライブラリー［マックナイト（McKnight）およびマッコノイ（McConaughy）により構築（1983）］で形質転換し、37℃におけるTrp-栄養要求性の形質転換体を選抜した。この形質転換体の生育は37℃で耐性を示したので、sec1-1に対しては依然として非許容的条件である36.5℃または35℃でさらに実験を行なった。36.5℃でTrp+表現型を分離し、生育を示す4種類の酵母突然変異株から単離

されたDNA（Keränen, 1986）を大腸菌（E. coli；

Hanahan, 1983) に導入した。この大腸菌形質転換体から単

離されたプラスミドDNAを用いて、*S. セリビシエ*の *sec1-1* 株を再度形質転換した。

このようにして、36.5℃で生育させるための効率的な形質転換が達成された。これらのプラスミドについて制限酵素解析を行なったところ、用いられたcDNAライブラリーから2種類の異なる配列が回収されたことがわかった。この2種類の異なるクローン1および7に由来する挿入DNAの塩基配列を、二本鎖ジデオキシ法 (Zagursky et al., 1986) により決定し、標準的な組換えDNA法 (Maniatis et al., 1982) または特異的プライマーを用いて好適なサブクローンを構築した。この2つのクローンは、それぞれ870ヌクレオチド (クローン1) および885ヌクレオチド (クローン7) のオープン・リーディング・フレームを含有していた。上記ヌクレオチド配列から推定されるアミノ酸配列は *Sec1* タンパク質のアミノ酸配列 (Aalto et al., 1991) とは異なるので、これらの新しい遺伝子を *SSO1* および *SSO2* (*SSO*: *Suppressor of Sec1 One*) と命名した。*SSO1* および *SSO2* の、それぞれのコード配列およびそれらの推定アミノ酸配列を、配列番号1および3に示す。*SSO1* および *SSO2* 遺伝子を担持するプラスミドは、それぞれ *YEpSSO1* および *YEpSSO2* と命名し、図1に示す。

実施例2: *YEpSSO2* で形質転換された酵母における *Sso2* タンパク質の過剰発現

コントロールのプラスミド *pMA56* (A) (Ammerer, 1983) あるいは *YEpSSO2* (B) のいずれかにより形質転換した酵母 *sf750-14D* 株を、*Trp* を含有しない合成完全培地 (Sherman et al., 1983) 上で生育させた。

Keränen (1986) に記載されている方法に従って、SDSの存在下で、該酵母細胞の溶解物を得た。この溶解物に存在する全酵母タンパク質10μgをSDS-PAGEにより分離し、ウサギにおける *Sso2* タンパク質に対するポリクロナール抗体およびアルカリホスファターゼ共役ヤギ抗ウサ

ギ Ig G を検出の際に用いたウェスタン・ブロッティングにより解析した。図 2 に示すように、YEpSSO2 形質転換体では、SSO2 タンパク質の分泌量が非常に増大した。

実施例 3：SSO1 遺伝子または SSO2 遺伝子を過剰発現する酵母 sf750-14D 株における異種分泌タンパク質（バチルス α -アミラーゼ）産生の増大
SSO1 遺伝子及び SSO2 遺伝子をそれぞれ含有する多コピープラスミド YEpSSO1 及び YEpSSO2 のいずれかを担持する酵母 sf750-14D α 株を、ADH1 プロモーター（Ruohonen et al., 1987）およびターミネーターの間に連結したバチルス α -アミラーゼ遺伝子を含有するプラスミド YEp α a6〔遺伝子をより効率的に発現するために、プロモーター要素に対し予想される 5' 端の抑制配列を

切除することにより修飾されている (modified for more efficient expression by deleting predicted inhibitory sequences 5' to the promoter element) (Ruohonen et al., 1991; Ruohonen et al., manuscript in preparation, a)) により形質転換した。上記のバチルス α -アミラーゼ遺伝子には、その発現をより効率的に行うために、予想される抑制性配列の 5' 端からプロモーター要素まで切除することにより修飾を加えている (Ruohonen et al., 1991; Ruohonen et al., manuscript in preparation, a)。こうして得られた、YEpSSO1 および YEp α a5 を含有する酵母株 (VTT-C-92072)、または YEpSSO2 および YEp α a5 を含有する酵母株 (VTT-C-92073) を選択培地上で 24℃ で生育させた。 α -アミラーゼの培地への分泌は、ファデバス (Phadebas) アミラーゼ検定キット [スウェーデン国、フェルマシア・ダイアグノステクス AB 社 (Pharmacia Diagnostics AB) 製] を用いて α -アミラーゼの活性を測定することによりモニターした。これらの菌株 VTT-C-92072 および VTT-C-92073 は、それぞれ寄託番号 DSM7253 および 7254 として、1992 年 9 月 30 日付でドイツ ザムルング フォン ミクロオーガニズメン ウントツェルクルツレーン ゲーエムベーハー [Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM)] に寄託した。図 3 に

示すように、

多コピープラスミドに導入されているSSO1遺伝子を担持する菌株(▲)または多コピープラスミドに導入されているSSO2遺伝子を担持する菌株(■)では、形質転換されていないコントロール株(●)よりも α -アミラーゼ活性は向上していた。該形質転換体からYE pSSO1を除去した菌株(Δ)またはYE pSSO2を除去した菌株(\square)では、 α -アミラーゼの分泌はコントロール株の示すレベルにまで低下した。このことにより、分泌はSSO遺伝子含有プラスミドの存在により向上することがわかる。培養培地における α -アミラーゼタンパク質量の増加は、ウェスタン・ブロッティングにより検出した(図4)。図3における記号、Sは標準(バチルス α -アミラーゼ)を表わす。

実施例4：SSO2遺伝子を過剰発現する酵母DBY746株における外来性分泌タンパク質(バチルス α -アミラーゼ)および内在性タンパク質(インベルターゼ)産生の増大

ADH1プロモーター(Ruohonen et al., 1987)およびターミネーターの間に連結したバチルス α -アミラーゼ遺伝子を含有するプラスミドYE p α a6〔遺伝子をより効率的に発現するために、プロモーター要素に対し予想される5'端の抑制配列を切除することにより修飾されている(Ruohonen et al., 1991; Ruohonen et al., manuscript in preparation, a)〕を担持するS. セレビシエ DBY 746株(α hi

s3 Δ 1 leu2-3 leu2-112 ura3-52 trp1-289 cgh^R)〔デビット・ボッティン(David Botstein; Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA)より入手〕を、YE pSSO2およびコントロールのプラスミドpMA56(Ammerer, 1983)のいずれかにより形質転換する。この形質転換体を選択培地で30℃で生育し、培養培地への α -アミラーゼの分泌を、ファデバスアミラーゼ検定キット(スウェーデン国、ファルマシア・ダイアグノステクス AB社製)を用いて α -アミラーゼ活性を測定することによりモニターした。図5に示すように、多コピープラ

スミドに導入されたSSO2遺伝子を担持する菌株(△)は、SSO遺伝子を含むコントロールのプラスミドで形質転換されたコントロール株(○)と比較して、 α -アミラーゼ活性が向上した。コントロールの形質転換体(●)とSSO2形質転換体(▲)には、酵母の生育に差異は全く認められなかった。同様に、SSO1遺伝子を過剰発現させると、 α -アミラーゼの分泌量が増加した。内在性タンパク質であるインベルターゼの分泌についても、対数増殖期後期から定常期初期にかけて測定を行なったところ、これらの条件下における分泌は増加した。YEpSSO2形質転換体における分泌インベルターゼ活性は、pMA5.6を含有するコントロールの形質転換体の1.4倍であった。SSO遺伝子の過剰

発現による、 α -アミラーゼ分泌増大効果は、増殖後期においてより著しくなるので、インベルターゼ分泌も増殖後期にはより増大すると考えられる。

YEpSSO2におけるSSO2遺伝子の発現に用いられるADH1プロモーター(上記参照)上にあると予想される抑制性配列を切除することにより、SSO2遺伝子の発現時間は延長し、分泌量の増大したSsoタンパク質は長時間存在可能になる。従って、バチルス α -アミラーゼの培地への最終的分泌レベルも高まる。この修飾ADH1プロモーターによる、単コピープラスミドに組込まれたSSO2遺伝子の発現も、Ssoタンパク質の分泌レベルを向上させ、 α -アミラーゼの分泌を促進する。

実施例5：正常レベルまたは増加されたレベルの機能性Ssoタンパク質の存在下におけるSEC1遺伝子過剰発現酵母における外来性分泌タンパク質(バチルス α -アミラーゼ)産生の増大

ADH1プロモーター[Ruohonen et al., 1987; 遺伝子をより効率的に発現するために、プロモーター要素に対し予想される5'端の抑制配列を切除することにより修飾されているもの(Ruohonen et al., 1991; Ruohonen et al., manuscript in preparation, a)]およびターミネーターの間に連結したバチルス α -アミラーゼ遺伝子を含有するプラスミドYEp α 6を担持するS. セレビシエ

6株を、SEC1遺伝子を発現する多コピープラスミドYE p SEC1およびコントロールのプラスミドYE p 24H (Aalto et al., 1991; Ruohonen et al., manuscript in preparation, b) のいずれかにより形質転換した。この形質転換体を選択培地で30℃で生育させ、培養培地への α -アミラーゼの分泌を、ファデバスアミラーゼ検定キット(スウェーデン国、ファルマシア・ダイアグノスティクス AB社製)を用いて α -アミラーゼ活性を測定することによりモニターした。図6に示すように、多コピープラスミドに導入されたSEC1遺伝子を担持する菌株(□)は、SEC1遺伝子を含むしないプラスミドで形質転換された菌株(○)と比較して、 α -アミラーゼ活性が向上した。この2種類の形質転換体において、その生育に差異は全く認められなかった。

SEC1タンパク質とSEC2タンパク質を同時に過剰発現させると、 α -アミラーゼの分泌はさらに促進された。SSO遺伝子を発現するプラスミドは、VTT [バイオテクニカル ラボラトリー (Biotechnical Laboratory; Espoo, Finland)] より入手できる。

実施例6：酵母における発現によるトリコデルマ s s o 遺伝子の単離および該遺伝子のトリコデルマにおける発現

T. レーセイQM9414株 (Buchert et al., フィンランド特許出願第922373号に記載) から調製した酵母発

現遺伝子バンクを、サッカロミセス・セレビシエH458株 [Aalto et al., 1993; α SUC2 ade2-1 can1-100 his3-11, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 sso1- δ 1::URA3 sso2- δ 2::leu2:: (GAL1:sso1, HIS3)] に導入して形質転換させ、ガラクトース培地におけるUra要求性変異株を選抜することにより形質転換体を得た。この形質転換体をグルコース培地へ移し、その成長コロニーから該プラスミドを取り出し、上記菌株に導入し形質転換させて相補性を確認した。このようにして、グルコース培地におけるSsoタンパク質消費に対する救済能を示すクローンが得られた。このクローンに対応するプラスミドをPMS51と命名した。得られたプラスミドPMS51を担持するS. セ

レビスエ株は、1993年10月5日ドイツ ザムルングフォン ミクロオー
ガニズメンウントツェルクルツレーン ゲー エム ベー ハー (DSM) に寄
託した (寄託番号: DSM8604)。この遺伝子の染色体コピーは、PCRに
より調製されるcDNAクローンの5'端を用いることにより、染色体コスミ
ドライブラリー

(Mäntylä et al., 1992) から単離される。また、該コスミ

ドは、シグナルを与えるクローンから単離され、上記cDNAに対応するコスミ
ドは、CBHI-Fab分子を産生するT.レーセイ (Penttilä et al., 1987)
株、すなわち、VT

T-D-91418 (CBS 287.91) に導入されて形質転換する (Nyyssonen et al.,
(特許出願) に記載)。CBHI-Fabの産生は、Solca-floc
培地における細胞外マトリックスから調べられる (Nyyssonen et al., 特許出願
)。

実施例7：異種ハイブリダイゼーションによる真菌sso遺伝子の単離

真菌種であるサッカロミセス・セレビスエ、シゾサッカロミセス・ポンベ、ク
ライベロミセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*)、ピヒア・ステイピティ
ス (*Pichia stipitis*)、アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulan*
s)およびトリコデルマ・レーセイから、それぞれ染色体DNAを単離した。該D
NAを制限酵素Hind IIIで消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動により
分画し、ナイロンフィルター上にブロットした。該フィルターのサザン・ブロッ
トハイブリダイゼーションは、酵母SSO1遺伝子コード領域をプローブとして
用いて、異なる厳密な条件下で行なった。ハイブリダイゼーションを、30%ホ
ルムアルデヒド、6×SSC、10×Denhardt溶液、5%SDS、10
0 μg/mlのニシン精子DNAおよび10 μg/mlのポリAを含有する混合
物中で35℃で行ない、2×SSCおよび0.1%SDSで30分間、2回洗浄
したところ、S. セレビスエ、K. ラクティス、P. ステイピティスおよびT.
レーセイ由来のDNAに対して、ハイ

ブリッドしたバンドがいくつか現れた(図8)。また、ハイブリダイゼーションをあまり厳密ではない条件下で行なったところ、S. ポンベについてもハイブリダイゼーションは観察された。 λ EMBL 3 (Frischauf et al., 1983) ベクターにおいて構築されたT. レーセイ遺伝子ライブラリーを、上記した操作によりハイブリッドさせた。ハイブリダイゼーション・シグナルを与えるクローンを精製し、それらのハイブリッドしている領域を、それらのDNAの消化およびサザン・プロット・ハイブリダイゼーションによりマップした。3種類のハイブリッドした λ クローンを、それぞれTSSOa、TSSObおよびTSSOcと命名した。これらのクローンは、1993年10月5日付でドイツ・ザムルング・フォン・ミクロオーガニズメン・ウント・ツェルクルツレーン・ゲー・エム・ベー・ハー(DSM)に寄託した(寄託番号: DSM 8601、DSM 8602およびDSM 8603)。

寄託微生物

ブタペスト条約に基き、以下の微生物をドイツ・ザムルング・フォン・ミクロオーガニズメン・ウント・ツェルクルツレーン・ゲー・エム・ベー・ハー(DSM; ドイツ国、ブラウンシュヴァイク D-3300 マシュローダー ヴェーク1B)に寄託した。

菌株	寄託番号	寄託日
サッカロミセス・セレビシエ VTT-C-92072 (プラスミド YEpSS01を担持)	DSM 7253	1992年9月30日
サッカロミセス・セレビシエ VTT-C-92073 (プラスミド YEpSS02を担持)	DSM 7254	1992年9月30日
サッカロミセス・セレビシエ H458 (VTT-C-93002) (プラスミド pMS51を担持)	DSM 8604	1993年10月5日
バクテリオファージ λ 株	DSM 8601	1993年10月5日

TSS0a (VTT-H-93001)

バクテリオファージλ株 DMS 8602 1993年10月5日

TSS0b (VTT-H-93002)

バクテリオファージλ株 DMS 8603 1993年10月5日

TSS0c (VTT-H-93003)

参考文献

- Aalto, M.K., Keränen, S. and Ronne, H. 1992. A family of proteins involved in intracellular transport. *Cell* 68, 181-182.
- Aalto, M.K., Ronne, H. and Keränen, S. 1993. Yeast syntaxins Sso1p and Sso2p belong to a family of membrane proteins that function in vesicular transport. *EMBO J.* 12, (in press).
- Aalto, M.K., Ruohonen, L., Hosono, K. and Keränen, S. 1991. Cloning and sequencing of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *SEC1* gene localized on chromosome IV. *Yeast* 7, 643-650.
- Ammerer, G. 1983. Expression of genes in yeast using the *ADC1* promoter. *Methods Enzymol.* 101, 192-201.
- Baldari, C., Murray, J.A.H., Ghiara, P., Cesareni, G. and Galeotti, C.L. 1987. A novel peptide leader which allows efficient secretion of a fragment of human interleukin 1 β in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 6, 229-234.
- Becherer, K.A. and Jones, E.W., 1992. Role of the *PEP12* gene product in vacuolar targeting in yeast. *EMBL Data Bank* 31, accession number M90395.
- Bennett, M.K., Calakos, N. and Scheller, R.H. 1992. Syntaxin: A synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at pre synaptic active zones. *Science* 257, 255-259.
- Buchert, J., Penttilä, M., Siika-aho, M., Saloheimo, A., Ranua, M. and Viikari, L. 1992. Mannanaasientsyymit, niitä koodittavat geenit ja menetelmä näiden eristämiseksi sekä menetelmä lignoselluloosapitoisen massan valkaisemiseksi (Mannanase enzymes, the encoding genes and method for their isolation, and a method for bleaching lignocellulose containing materials). *FI Pat. Appl.* 92 2373.
- Buckholz, R.G. and Gleeson, M.A. 1991. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Bio/Technology* 9, 1067-1072.
- Dunn-Coleman, N., Bloebaum, P., Berka, R., Bodie, E., Robinson, N., Armstrong, G., Ward, M., Przetak, M., Carter, G., LaCost, R., Wilson, L., Kodama, K., Baliu, E., Bower, B., Lamsa, M. and Heinsohn, H. 1991. Commercial levels of chymosin production by *Aspergillus*. *Bio/Technology* 9: 976-981.
- Fawell, E., Hook, S. and Armstrong, J., 1989. Nucleotide sequence of a gene encoding a YPT1-related protein from *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucl. Acid Res.* 11, 4373.

- Frischauf, A.-M., Lerach, H., Poustka, A. and Murray, N., 1983. Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* 170, 827-842.
- Gerst, F.E., Rodgers, L., Riggs, M. and Wigler, M. 1992. *SNC1*, a yeast homolog of the synaptic vesicle-associated membrane protein/synaptobrevin gene family: Genetic interactions with the *RAS* and *CAP* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4338-4342.
- Greenberg, G., Shelness, G.S. and Blobel, G., 1989. A subunit of mammalian signal peptidase is homologous to yeast *SEC11* protein. *J. Biol. Chem.* 264, 15762-15765.
- Hallborn, J., Penttilä, M., Ojamo, H., Keränen, S. & Hahn-Hägerdal, B. 1990. Xylose utilization by recombinant yeasts. *International Pat. Appl. WO 91/15588*.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- Hardwick, K.G. and Pelham, H.R.B. 1992. *SED5* encodes a 39 KD integral membrane protein required for vesicular transport between the ER and the Golgi complex. *EMBL Data Bank* 32, accession number X66980.
- Harkki, A., Uusitalo, J., Bailey, M., Penttilä, M. & Knowles, J.K.C. 1989. A novel fungal expression system: secretion of active calf chymosin from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology* 7: 596-603.
- Haubruck, H., Prange, R., Vorgias, C. and Gallwitz, D. 1989. The ras-related mouse *ypt1* protein can functionally replace the YTP1 gene product in yeast. *EMBO J.* 8, 1427-1432.
- Hirai, Y., Takebe, K., Takashina, M., Kobayashi, S. and Takeichi, M. 1992. Epimorphin: a mesenchymal protein essential for epithelial morphogenesis. *Cell* 69, 471-481.
- Inoue, A., Obata, K. and Agakawa, K. 1992. Cloning and sequence analysis of cDNA for a neuronal cell membrane antigen, HPC-1. *J. Biol. Chem.* 267, 10613-10619.
- Irani, M.H. and Kilgore, T.L. 1988. High level expression in yeast. *European patent application EP 0 284 044 A1*.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. 1983. Transformation of intact yeast cells with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153, 163-168.
- Jeenes, D., MacKenzie, D., Roberts, I. and Archer, D. 1991. Heterologous protein production by filamentous fungi. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, vol. 9. Pp. 327-367.

- Keränen, S. 1986. Synthesis and processing of Semliki forest virus polyprotein in *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast type glycosylation of E1 envelope protein. *Gene* 48, 267-275.
- Lamsa, M. and Bloebaum, P. 1990. Mutation and screening to increase chymosin yield in a genetically-engineered strain of *Aspergillus avamori*. *J. Ind. Microbiol.* 5, 229-238.
- Lopez, M.C., Nicand, J.M. and Gaillardin, C., 1992. SEC14 deleted mutant of *Yarrowia lipolytica* is altered in the secretion and differentiation processes. 16th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology. Vienna, Austria, Aug. 15-21, 1992, *Yeast* 8 (Spec. Issue) p. 473.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning, A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Martegani, E., Forlani, N., Mauri, I., Porro, D., Schleuning, W.D. and Alberghina, L. 1992. Expression of high levels of human tissue plasminogen activator in yeast under the control of an inducible GAL promoter. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 604-608.
- McKnight, G.L. and McConnaughy, B.L.. 1983. Selection of functional cDNAs by complementation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4412-4416.
- Mäntylä, A., Rossi, H., Vanhanen, S., Penttilä, M., Suominen, P. and Nevalainen, H. 1992. Electrophoretic karyotyping of wild type and mutant *Trichoderma reesei* strains. *Current Genetics* 21:471-477.
- Novick, P. and Scheckman, R., 1979. Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1858-1862.
- Novick, P., Ferro, S. and Scheckman, R. 1981. Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell* 25, 461-469.
- Novick, P., Fields, C. and Scheckman, R. 1980. Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* 21, 205-215.
- Nyyssönen, E., Keränen, S., Penttilä, M., Takkinen, K. and Knowles, J. K. C. 1990. Immunoglobulin production by *Trichoderma*. *US Pat. Appl.* 552757.
- Nyyssönen, E., Penttilä, M., Harkki, A., Saloheimo, A., Knowles, J.K.C. and Keränen, S. 1993. Efficient production of antibodies by the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology* 11, 591-595.

- Penttilä, M.E., Nevalainen, H., Rättö, M., Salminen, E. and Knowles, J.K.C. 1987. A versatile transformation system for the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene* 61, 155-164.
- Protopopov, V., Govindan, B., Novick, P. and Gerst, J.E. 1993. Homologs of the synaptobrevin/VAMP family of synaptic vesicle proteins function on the late secretory pathway in *S. cerevisiae*. *Cell* 74, (in press).
- Romanos, M.A., Scorer, C.A. and Clare, J.J. 1992. Foreign gene expression in yeast: a Review. *Yeast* 8, 423-488.
- Ruohonen, L., Hackman, P., Lehtovaara, P., Knowles, J.C.K. and Keränen, S. 1987. Efficient secretion of *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase by its own signal peptide in *Saccharomyces cerevisiae* host cells. *Gene* 59, 161-170.
- Ruohonen, L., Penttilä, M. and Keränen, S. 1991. Optimization of *Bacillus* α -amylase production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7, 337-346.
- Sakai, A., Shimizu, Y. and Hishinuma, F. 1988. Isolation and characterization of mutants which show an oversecretion phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 119, 499-506.
- Schuster, J.R., Moyer, D.L., Lee, H., Dennis, A., Smith, B. and Merryweather, J.P. 1989. *Gene* 83, 47-55.
- Segev, N., Mulholland, J. and Botstein, D., 1988. The yeast GTP-binding YTP1-protein and a mammalian counterpart are associated with the secretion machinery. *Cell* 52, 915-924.
- Sikorski, R.S. and Hieter, P. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.
- Sleep, D., Belfield, G.P., Ballance, D.J., Steven, J., Jones, S. Evans, L.R., Moir, P.D. and Goodey, A.R. 1991. *Saccharomyces cerevisiae* strains that overexpress heterologous proteins. *Bio/Technology* 9, 183-187.
- Smith, R.A., Duncan, M.J. and Moir, D.T. 1985. Heterologous protein secretion from yeast. *Science* 229, 1219-1224.
- Suzuki, K., Ichikawa, K. and Jigami, Y. 1989. Yeast mutants with enhanced ability to secrete human lysozyme: Isolation and identification of a protease-deficient mutant. *Mol. Gen. Genet.* 219, 58-64.
- Vanoni, M., Porro, D., Martegani, E. and Alberghina, L. 1989. Secretion of *Escherichia coli* β -galactosidase in *Saccharomyces cerevisiae* using the signal

sequence from the glucoamylase-encoding *STA2* gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 1331-1338.

Ward, M., Wilson, L.J., Kodama, K.H., Rey, M.W. and Berka, R.M. 1990. Improved production of calf chymosin in *Aspergillus* by expression as a glucoamylase-chymosin fusion.

Wilson, D.W., Wilcox, C.A., Flynn, G.C., Chen, E., Unang, W.-J., Henzel, W.J., Block, M.R., Ullrich, A. and Rothman, J.E., 1989. A fusion protein required for vehicle-mediated transport in both mammalian cells and yeasts. *Nature* 339, 355-359.

Zagursky, R.J., Berman, M.L., Baumeister, K. and Lomax, N. 1986. Rapid and easy sequencing of large linear double stranded DNA and supercoiled plasmid DNA. *Gene Anal. Techn.* 2, 89-94.

Zaraoui, A., Touchot, N., Chardin, P. and Tavitian, A. 1989. The human Rab genes encode family of GTP-binding proteins related to yeast YTP1 and SEC4 products involved in secretion. *J. Biol. Chem.* 264, 12394-12401.

配列表

(1) 一般情報

(i) 出願人:

(A) 名称: バルティオン テクニリーネン

トゥキムスケスクス

(B) 街路: プオリミエヘンティエ 5

(C) 市 : エスポー

(E) 国 : フィンランド

(F) 郵便番号 (ZIP) : FIN-02150

(ii) 発明の名称: 組換え真核細胞による分泌タンパク

質の増大された産生

(iii) 配列の数: 4

(iv) コンピューター読取り形態:

(A) 媒体の種類: フロッピーディスク

(B) コンピューター: IBM PC 共に使用可

(C) 操作システム: PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア: パテントイン・リリース

1. 0, バージョン # 1. 25 (EPO)

(vi) 先行出願データ:

(A) 出願番号: F I 92 4494

(B) 出願日: 1992年10月6日

(2) 配列番号1に関する情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 870塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: cDNAからmRNA

(vi) 起源

(A) 生物名: サッカロミセス・セレビシエ

(B) 株: X2180-1B

(ix) 特徴:

(A) 名称/特徴を表わす記号: CDS

(B) 存在位置: 1..870

(xi) 配列: 配列番号1

ATG AGT TAT AAT AAT CCG TAC CAG TTG GAA ACC CCT TTT GAA GAG TCA	48
Met Ser Tyr Asn Asn Pro Tyr Gln Leu Glu Thr Pro Phe Glu Glu Ser	
1 5 10 15	
TAC GAG TTG GAC GAA GGT TCG AGC GCT ATC GGT GCT GAA GGC CAC GAT	96
Tyr Glu Leu Asp Glu Gly Ser Ser Ala Ile Gly Ala Glu Gly His Asp	
20 25 30	
TTC GTG GGC TTC ATG AAT AAG ATC AGT CAA ATC AAT CGC GAT CTC GAT	144
Phe Val Gly Phe Met Asn Lys Ile Ser Gln Ile Asn Arg Asp Leu Asp	
35 40 45	
AAG TAC GAC CAT ACC ATC AAC CAG CTC GAT TCT TTC CAT AAG AGG CTA	192
Lys Tyr Asp His Thr Ile Asn Gln Val Asp Ser Leu His Lys Arg Leu	
50 55 60	

CTG ACC GAA GTT AAT GAG GAG CAA GCA AGT CAC TTA AGG CAC TCC CTG Leu Thr Glu Val Asn Glu Glu Gln Ala Ser His Leu Arg His Ser Leu 65 70 75 80	240
GAC AAC TTC GTC GCA CAA GCC ACG GAC TTG CAG TTC AAA CTG AAA AAT Asp Asn Phe Val Ala Gln Ala Thr Asp Leu Gln Phe Lys Leu Lys Asn 85 90 95	288
GAG ATT AAA AGT GCC CAA AGG GAT GGG ATA CAT GAC ACC AAC AAG CAA Glu Ile Lys Ser Ala Gln Arg Asp Gly Ile His Asp Thr Asn Lys Gln 100 105 110	336
GCT CAG GCG GAA AAC TCC AGA CAA AGA TTT TTG AAG CTT ATC CAG GAC Ala Gln Ala Glu Asn Ser Arg Gln Arg Phe Leu Lys Leu Ile Gln Asp 115 120 125	384
TAC AGA ATT GTG GAT TCC AAC TAC AAG GAG GAG AAT AAA GAG CAA GCC Tyr Arg Ile Val Asp Ser Asn Tyr Lys Glu Glu Asn Lys Glu Gln Ala 130 135 140	432
AAG AGG CAG TAT ATG ATC ATT CAA CCA GAG GCC ACC GAA GAT GAA GTT Lys Arg Gln Tyr Met Ile Ile Gln Pro Glu Ala Thr Glu Asp Glu Val 145 150 155 160	480
GAA GCA GCC ATA AGC GAT GTA GGG GGC CAG CAG ATC TTC TCA CAA GCA Glu Ala Ala Ile Ser Asp Val Gly Gly Gln Gln Ile Phe Ser Gln Ala 165 170 175	528
TTG TTG AAT GCT AAC AGA CGT GGG GAA GCC AAG ACT GCT CTT GCG GAA Leu Leu Asn Ala Asn Arg Arg Gly Glu Ala Lys Thr Ala Leu Ala Glu 180 185 190	576
GTC CAG GCA AGG CAC CAA GAG TTA TTG AAA CTA GAA AAA TCC ATG GCA Val Gln Ala Arg His Gln Glu Leu Leu Lys Leu Glu Lys Ser Met Ala 195 200 205	624
GAA CTT ACT CAA TTG TTT AAT GAC ATG GAA GAA CTC GTA ATA GAA CAA Glu Leu Thr Gln Leu Phe Asn Asp Met Glu Glu Leu Val Ile Glu Gln 210 215 220	672
CAA GAA AAC GTA GAC GTC ATC GAC AAG AAC GTT GAA GAC GCT CAA CTC Gln Glu Asn Val Asp Val Ile Asp Lys Asn Val Glu Asp Ala Gln Leu 225 230 235 240	720
GAC GTA GAA CAG GGT GTC GGT CAT ACC GAT AAA GCC GTC AAG AGT GCC Asp Val Glu Gln Gly Val Gly His Thr Asp Lys Ala Val Lys Ser Ala 245 250 255	768
AGA AAA GCA AGA AAG AAC AAG ATT AGA TGT TGG TTG ATT GTA TTC GCC Arg Lys Ala Arg Lys Asn Lys Ile Arg Cys Trp Leu Ile Val Phe Ala 260 265 270	816
ATC ATT GTA GTC GTT GTT GTT GTC GTT GTT GTC CCA GCC GTT GTC AAA Ile Ile Val Val Val Val Val Val Val Val Val Val Pro Ala Val Val Lys 275 280 285	864
ACG CGT Thr Arg 290	870

(2) 配列番号2に関する情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 290アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類：タンパク質

(xi) 配列：配列番号2

```

Met Ser Tyr Asn Asn Pro Tyr Gln Leu Glu Thr Pro Phe Glu Glu Ser
 1           5          10          15
Tyr Glu Leu Asp Glu Gly Ser Ser Ala Ile Gly Ala Glu Gly His Asp
          20          25          30
Phe Val Gly Phe Met Asn Lys Ile Ser Gln Ile Asn Arg Asp Leu Asp
          35          40          45
Lys Tyr Asp His Thr Ile Asn Gln Val Asp Ser Leu His Lys Arg Leu
          50          55          60
Leu Thr Glu Val Asn Glu Glu Gln Ala Ser His Leu Arg His Ser Leu
          65          70          75          80
Asp Asn Phe Val Ala Gln Ala Thr Asp Leu Gln Phe Lys Leu Lys Asn
          85          90          95
Glu Ile Lys Ser Ala Gln Arg Asp Gly Ile His Asp Thr Asn Lys Gln
          100          105          110
Ala Gln Ala Glu Asn Ser Arg Gln Arg Phe Leu Lys Leu Ile Gln Asp
          115          120          125

Tyr Arg Ile Val Asp Ser Asn Tyr Lys Glu Glu Asn Lys Glu Gln Ala
          130          135          140
Lys Arg Gln Tyr Met Ile Ile Gln Pro Glu Ala Thr Glu Asp Glu Val
          145          150          155          160
Glu Ala Ala Ile Ser Asp Val Gly Gly Gln Gln Ile Phe Ser Gln Ala
          165          170          175
Leu Leu Asn Ala Asn Arg Arg Gly Glu Ala Lys Thr Ala Leu Ala Glu
          180          185          190
Val Gln Ala Arg His Gln Glu Leu Leu Lys Leu Glu Lys Ser Met Ala
          195          200          205
Glu Leu Thr Gln Leu Phe Asn Asp Met Glu Glu Leu Val Ile Glu Gln
          210          215          220
Gln Glu Asn Val Asp Val Ile Asp Lys Asn Val Glu Asp Ala Gln Leu
          225          230          235          240
Asp Val Glu Gln Gly Val Gly His Thr Asp Lys Ala Val Lys Ser Ala
          245          250          255
Arg Lys Ala Arg Lys Asn Lys Ile Arg Cys Trp Leu Ile Val Phe Ala
          260          265          270
Ile Ile Val Val Val Val Val Val Val Val Val Val Pro Ala Val Val Lys
          275          280          285
Thr Arg
          290

```

(2) 配列番号3に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：885塩基対

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: cDNAからmRNA

(vi) 起源

(A) 生物名: サッカロミセス・セレビシエ

(B) 株: X2180-1B

(ix) 特徴:

(A) 名称/特徴を表わす記号: CDS

(B) 存在位置 : 1...885

(xi) 配列: 配列番号3

ATG AGC AAC CCT AAT CCT TAT GAG AAT AAC AAT CCG TAC GCT GAA AAC	48
Met Ser Asn Ala Asn Pro Tyr Glu Asn Asn Asn Pro Tyr Ala Glu Asn	
1 5 10 15	
TAT GAA ATG CAA GAG GAC TTG AAC AAT GCT CCT ACT GGT CAC TCA GAT	96
Tyr Glu Met Gln Glu Asp Leu Asn Asn Ala Pro Thr Gly His Ser Asp	
20 25 30	
GGT AGC GAC GAT TTC GTA GCT TTT ATG AAC AAG ATC AAC TCA ATA AAT	144
Gly Ser Asp Asp Phe Val Ala Phe Met Asn Lys Ile Asn Ser Ile Asn	
35 40 45	
GCT AAC TTG TCC AGG TAC GAA AAC ATT ATC AAC CAA ATT GAT GCG CAA	192
Ala Asn Leu Ser Arg Tyr Glu Asn Ile Ile Asn Gln Ile Asp Ala Gln	
50 55 60	
CAC AAA GAC CTA CTT ACT CAA GTC AGT GAG GAA CAG GAG ATG GAA TTG	240
His Lys Asp Leu Leu Thr Gln Val Ser Glu Glu Gln Glu Met Glu Leu	
65 70 75 80	

AGA CGT TCT TTG GAC GAT TAC ATC TCT CAG GCC ACA GAT TTG CAG TAT Arg Arg Ser Leu Asp Asp Tyr Ile Ser Gln Ala Thr Asp Leu Gln Tyr 85 90 95	288
CAA TTG AAA GCG GAT ATC AAA GAT GCC CAG AGA GAC GGA TTG CAC GAC Gln Leu Lys Ala Asp Ile Lys Asp Ala Gln Arg Asp Gly Leu His Asp 100 105 110	336
TCT AAT AAA CAG GCA CAA GCT GAA AAT TGC AGA CAG AAA TTC TTA AAA Ser Asn Lys Gln Ala Gln Ala Glu Asn Cys Arg Gln Lys Phe Leu Lys 115 120 125	384
TTA ATT CAA GAC TAC AGA ATT ATC GAT TCT AAC TAC AAA GAA GAA AGC Leu Ile Gln Asp Tyr Arg Ile Ile Asp Ser Asn Tyr Lys Glu Glu Ser 130 135 140	432
AAA GAG CAG GCG AAG AGA CAG TAC ACA ATT ATC CAA CCC GAA GCC ACT Lys Glu Gln Ala Lys Arg Gln Tyr Thr Ile Ile Gln Pro Glu Ala Thr 145 150 155 160	480
GAC GAA GAA GTG GAA GCC GCC ATC AAC GAT GTC AAT GCC CAG CAG ATC Asp Glu Glu Val Glu Ala Ala Ile Asn Asp Val Asn Gly Gln Gln Ile 165 170 175	528
TTT TCC CAA GCG TTG CTA AAC GCC AAT AGA CGT GGT GAG GCC AAG ACA Phe Ser Gln Ala Leu Leu Asn Ala Asn Arg Arg Gly Glu Ala Lys Thr 180 185 190	576
GCA TTG GCC GAA GTA CAG GCT AGA CAT CAA GAG TTG TTG AAG TTG GAA Ala Leu Ala Glu Val Gln Ala Arg His Gln Glu Leu Leu Lys Leu Glu 195 200 205	624
AAA ACA ATC GCT GAA CTT ACC CAA TTG TTC AAT GAC ATG AAA GAG TTG Lys Thr Met Ala Glu Leu Thr Gln Leu Phe Asn Asp Met Lys Glu Leu 210 215 220	672
GTC ATC GAA CAA CAA GAA AAT GTG GAT CTC ATT GAC AAA AAC GTC GAA Val Ile Glu Gln Gln Glu Asn Val Asp Val Ile Asp Lys Asn Val Glu 225 230 235 240	720
GAC GCT CAG CAA GAT GTA GAG CAA GGT GTG GGT CAC ACC AAC AAG GCC Asp Ala Gln Gln Asp Val Glu Gln Gly Val Gly His Thr Asn Lys Ala 245 250 255	768
GTT AAG AGT GCC AGA AAA GCA AGA AAA AAC AAA ATA AGA TGT TTG ATC Val Lys Ser Ala Arg Lys Ala Arg Lys Asn Lys Ile Arg Cys Leu Ile 260 265 270	816
ATC TGC TTT ATT ATC TTT GCT ATT GTT GTT GTC GTT GTG GTT GTT CCA Ile Cys Phe Ile Ile Phe Ala Ile Val Val Val Val Val Val Val Pro 275 280 285	864
TCC GTT GTG GAA ACA AGA AAG Ser Val Val Glu Thr Arg Lys 290 295	885

(2) 配列番号4に関する情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 295アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号 4

Met Ser Asn Ala Asn Pro Tyr Glu Asn Asn Asn Pro Tyr Ala Glu Asn
 1 5 10 15
 Tyr Glu Met Gln Glu Asp Leu Asn Asn Ala Pro Thr Gly His Ser Asp
 20 25 30
 Gly Ser Asp Asp Phe Val Ala Phe Met Asn Lys Ile Asn Ser Ile Asn
 35 40 45
 Ala Asn Leu Ser Arg Tyr Glu Asn Ile Ile Asn Gln Ile Asp Ala Gln
 50 55 60
 His Lys Asp Leu Leu Thr Gln Val Ser Glu Glu Gln Glu Met Glu Leu
 65 70 75 80
 Arg Arg Ser Leu Asp Asp Tyr Ile Ser Gln Ala Thr Asp Leu Gln Tyr
 85 90 95
 Gln Leu Lys Ala Asp Ile Lys Asp Ala Gln Arg Asp Gly Leu His Asp
 100 105 110

 Ser Asn Lys Gln Ala Gln Ala Glu Asn Cys Arg Gln Lys Phe Leu Lys
 115 120 125
 Leu Ile Gln Asp Tyr Arg Ile Ile Asp Ser Asn Tyr Lys Glu Glu Ser
 130 135 140
 Lys Glu Gln Ala Lys Arg Gln Tyr Thr Ile Ile Gln Pro Glu Ala Thr
 145 150 155 160
 Asp Glu Glu Val Glu Ala Ala Ile Asn Asp Val Asn Gly Gln Gln Ile
 165 170 175
 Phe Ser Gln Ala Leu Leu Asn Ala Asn Arg Arg Gly Glu Ala Lys Thr
 180 185 190

 Ala Leu Ala Glu Val Gln Ala Arg His Gln Glu Leu Leu Lys Leu Glu
 195 200 205
 Lys Thr Met Ala Glu Leu Thr Gln Leu Phe Asn Asp Met Lys Glu Leu
 210 215 220
 Val Ile Glu Gln Gln Glu Asn Val Asp Val Ile Asp Lys Asn Val Glu
 225 230 235 240
 Asp Ala Gln Gln Asp Val Glu Gln Gly Val Gly His Thr Asn Lys Ala
 245 250 255
 Val Lys Ser Ala Arg Lys Ala Arg Lys Asn Lys Ile Arg Cys Leu Ile
 260 265 270
 Ile Cys Phe Ile Ile Phe Ala Ile Val Val Val Val Val Val Val Pro
 275 280 285
 Ser Val Val Glu Thr Arg Lys
 290 295

【図1A】

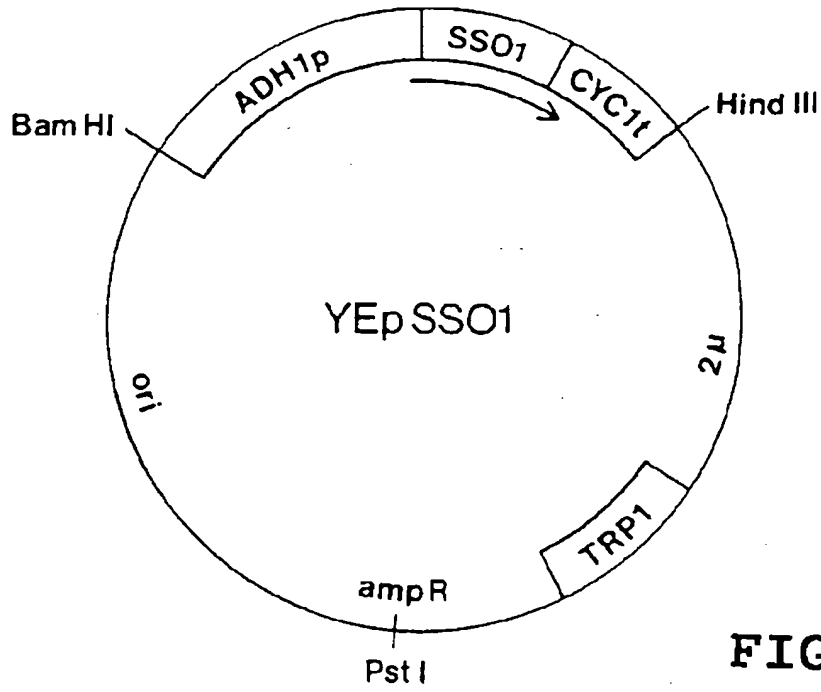


FIG. 1A

【図1B】

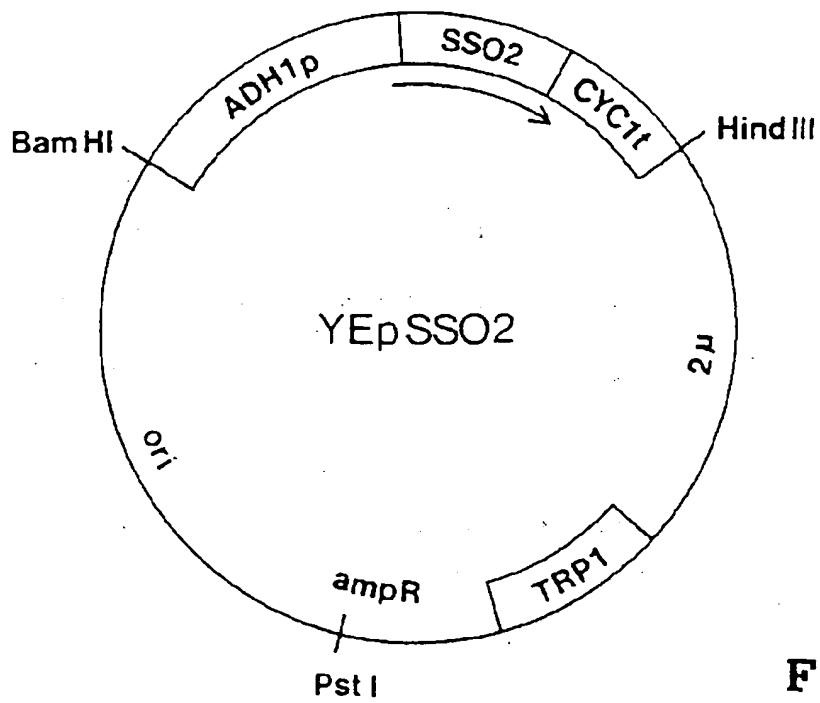



FIG. 1B

【図2】

A B

Sso2p- **FIG. 2**

【图3】

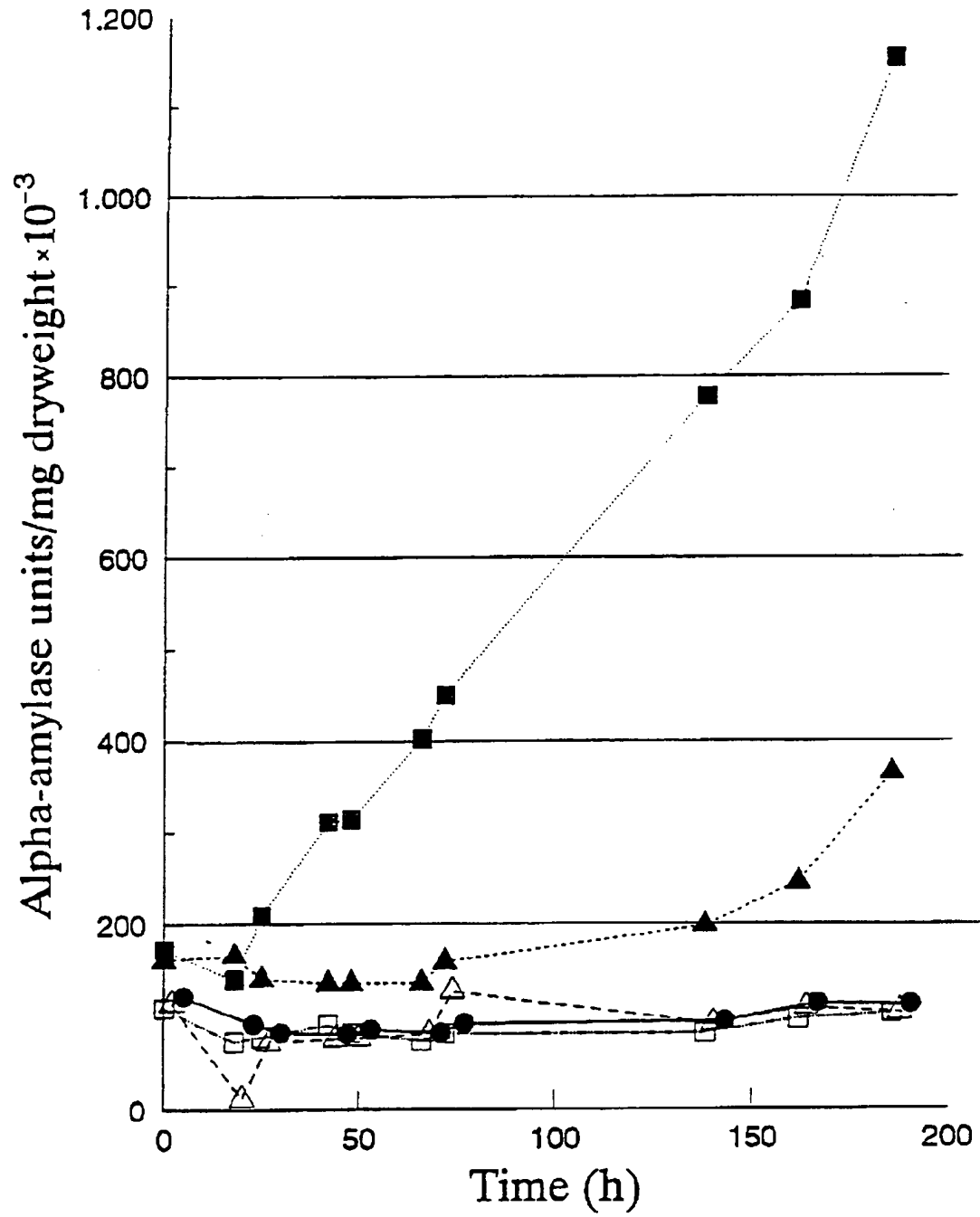


FIG. 3

【図4】

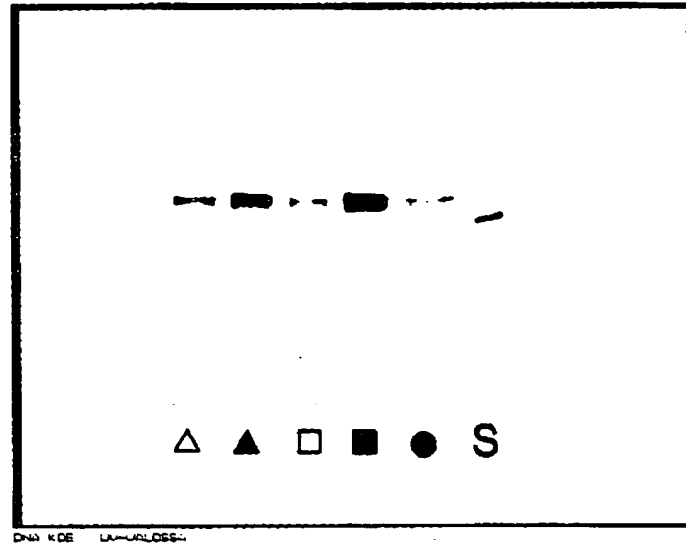


FIG. 4

【图5】

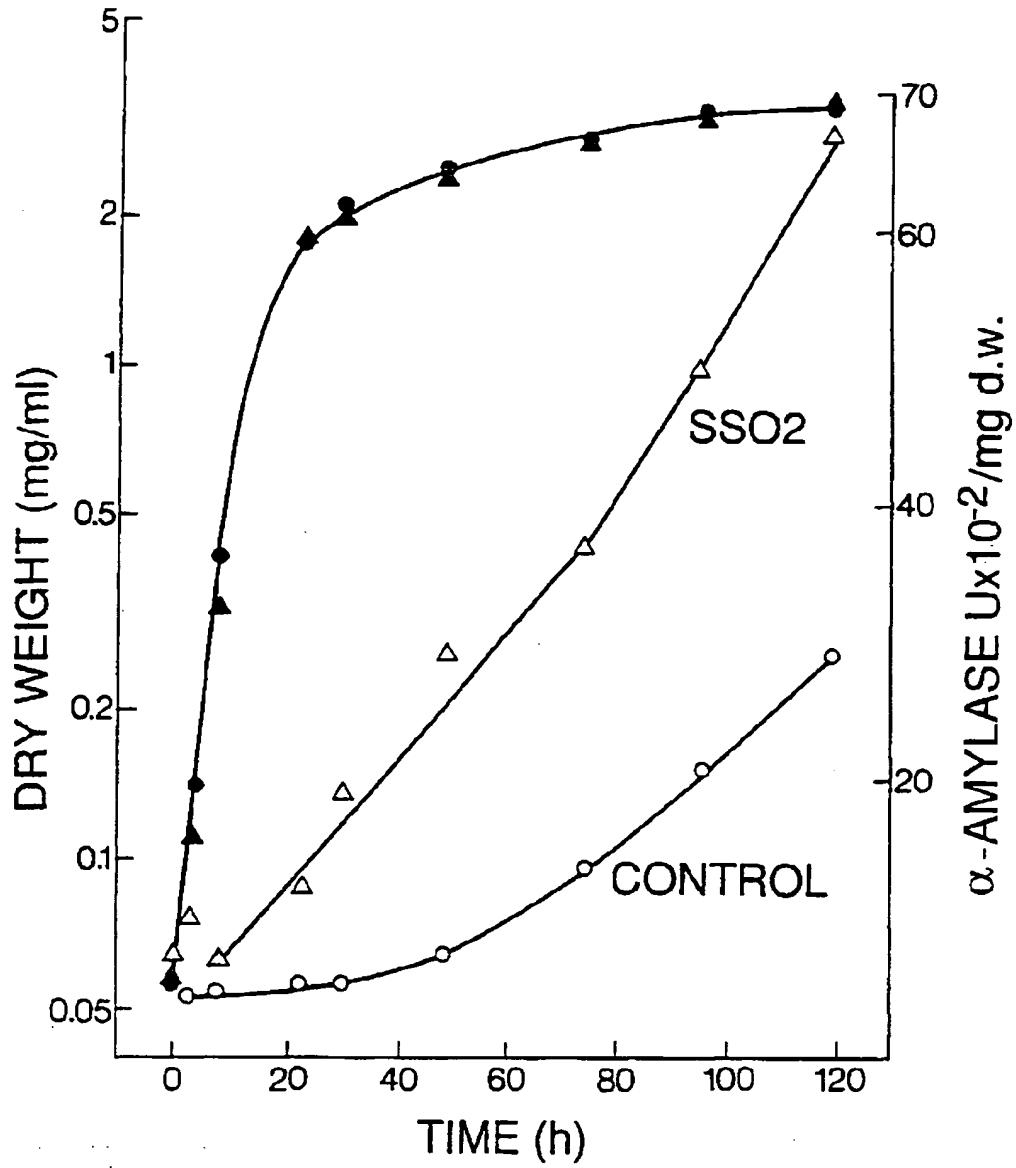


FIG. 5

【图6】

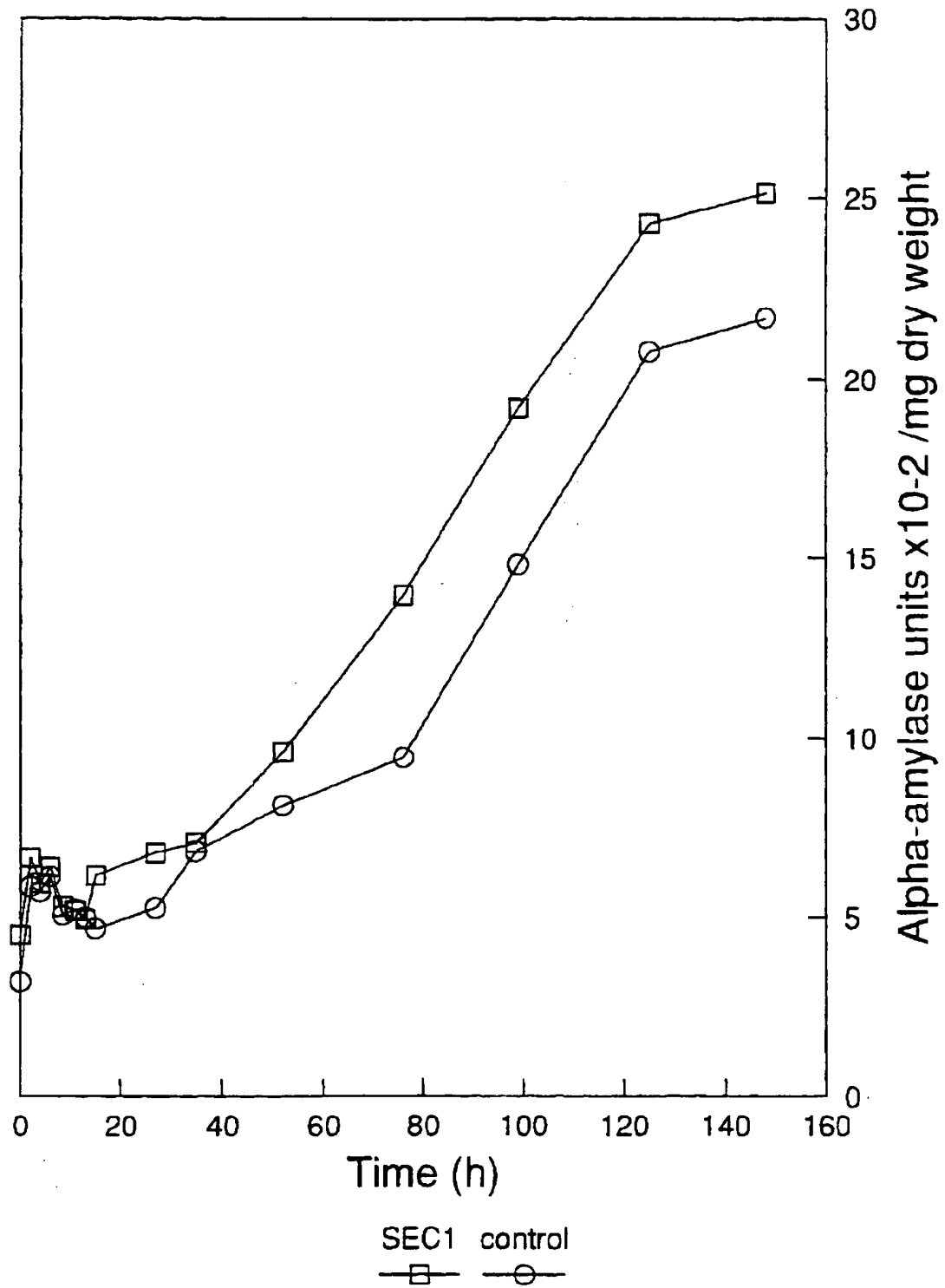


FIG. 6

【图7】

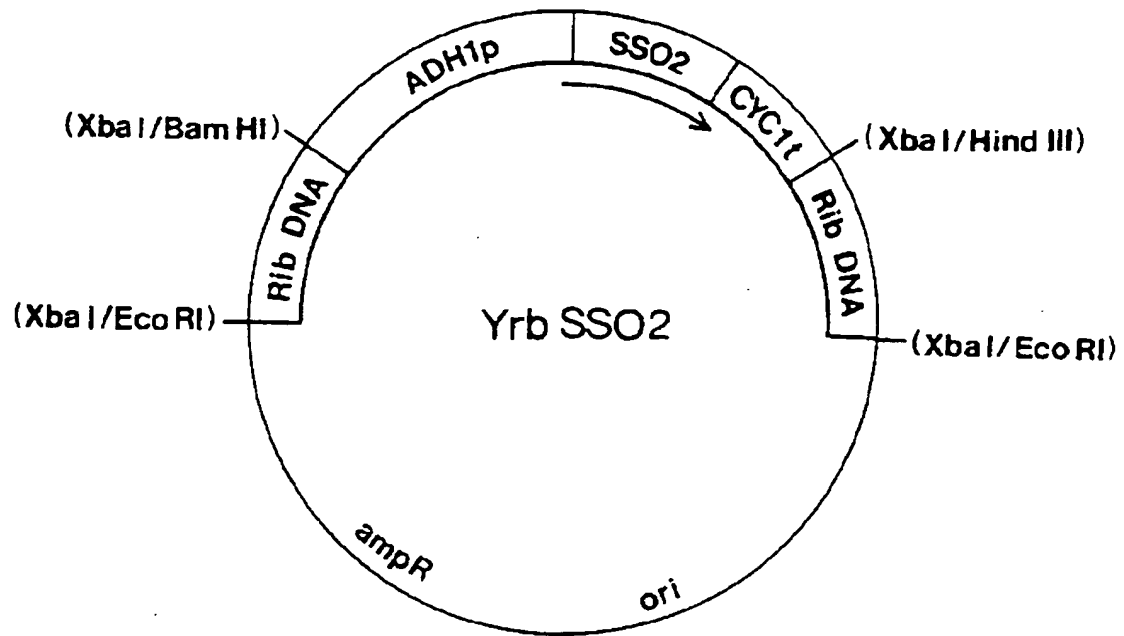


FIG. 7

【图8】



1. *Saccharomyces cerevisiae*
2. *Schizosaccharomyces pombe*
3. *Kluyveromyces lactis*
4. *Pichia stipitis*
5. *Aspergillus nidulans*
6. *Trichoderma reesei*
7. plasmid control

FIG. 8

【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1994年12月21日

【補正内容】

能を有する、より高等な真核生物の新規な細胞株の構築に用い得ることが示される。

したがって、本発明は、新規な組換え真核細胞、好ましくは、Ssoタンパク質を高レベルで発現する真菌宿主細胞、特にSso1タンパク質および／またはSso2タンパク質を高レベルで発現する酵母株、およびトリコデルマSsoタンパク質を高レベルで発現するトリコデルマ株を提供するものである。また、本発明は、SEC1遺伝子のようにSSO遺伝子と相互作用する遺伝子を過剰発現することにより、分泌タンパク質の産生を増大する方法を提供する。

本発明による、SSO遺伝子またはSSO遺伝子と相互作用する遺伝子により形質転換される真核細胞は、分泌タンパク質産生能が向上する。また、本発明による新規な真核細胞、特に酵母および糸状菌類は、さらに効率的な加水分解酵素の産生および重合性物質等の加水分解に用いられる。このような菌類を用いれば、細胞量の増加による単一細胞またはビール酵母産生のような生物工学的なプロセス、あるいは加水分解酵素の効率的な産生および／または植物性材料の効率的な加水分解が有益とされるその他のプロセスが改善される。

図面の簡単な説明

図1Aおよび1Bは、多コピープラスミドpMAC561に、S. セレビシエSSO1遺伝子およびSSO2遺伝子のcDNAをそれぞれ組み込んで得られるプラスミドYE pS

SO1および

離されたプラスミドDNAを用いて、S. セレビシエのsec1-1株を再度形質転換した。

このようにして、36.5℃で生育させるための効率的な形質転換が達成された。これらのプラスミドについて制限酵素解析を行なったところ、用いられたc

DNAライブラリーから2種類の異なる配列が回収されたことがわかった。この2種類の異なるクローン1および7に由来する挿入DNAの塩基配列を、二本鎖ジデオキシ法 (Zagursky et al., 1986) により決定し、標準的な組換えDNA法 (Maniatis et al., 1982) または特異的プライマーを用いて好適なサブクローンを構築した。この2つのクローンは、それぞれ870ヌクレオチド (クローン1) および885ヌクレオチド (クローン7) のオープン・リーディング・フレームを含有していた。上記ヌクレオチド配列から推定されるアミノ酸配列はSec1タンパク質のアミノ酸配列 (Aalto et al., 1991) とは異なるので、これらの新しい遺伝子をSSO1およびSSO2 (SSO: Suppressor of Sec1 Que) と命名した。SSO1およびSSO2の、それぞれのコード配列およびそれらの推定アミノ酸配列を、配列番号1および3に示す。SSO1およびSSO2遺伝子を担持するプラスミドは、それぞれYEpSSO1およびYEpSSO2と命名し、図1Aおよび1Bに示す。

実施例2: YEpSSO2で形質転換された酵母における

Sso2タンパク質の過剰発現

- Penttilä, M.E., Nevalainen, H., Rättö, M., Salminen, E. and Knowles, J.K.C. 1987. A versatile transformation system for the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene* 61, 155-164.
- Protopopov, V., Govindan, B., Novick, P. and Gerst, J.E. 1993. Homologs of the synaptobrevin/VAMP family of synaptic vesicle proteins function on the late secretory pathway in *S. cerevisiae*. *Cell* 74, (in press).
- Romanos, M.A., Scorer, C.A. and Clare, J.J. 1992. Foreign gene expression in yeast: a Review. *Yeast* 8, 423-488.
- Ruohonen, L., Hackman, P., Lehtovaara, P., Knowles, J.C.K. and Keränen, S. 1987. Efficient secretion of *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase by its own signal peptide in *Saccharomyces cerevisiae* host cells. *Gene* 59, 161-170.
- Ruohonen, L., Penttilä, M. and Keränen, S. 1991. Optimization of *Bacillus* α -amylase production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7, 337-346.
- Sakai, A., Shimizu, Y. and Hishinuma, F. 1988. Isolation and characterization of mutants which show an oversecretion phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 119, 499-506.
- Schuster, J.R., Moyer, D.L., Lee, H., Dennis, A., Smith, B. and Merryweather, J.P. 1989. Yeast mutants conferring resistance to toxic effects of cloned human insulin-like growth factor I. *Gene* 83, 47-55.
- Segev, N., Mulholland, J. and Botstein, D., 1988. The yeast GTP-binding YTP1-protein and a mammalian counterpart are associated with the secretion machinery. *Cell* 52, 915-924.
- Sikorski, R.S. and Hieter, P. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.
- Sleep, D., Belfield, G.P., Ballance, D.J., Steven, J., Jones, S. Evans, L.R., Moir, P.D. and Goodey, A.R. 1991. *Saccharomyces cerevisiae* strains that overexpress heterologous proteins. *Bio/Technology* 9, 183-187.
- Smith, R.A., Duncan, M.J. and Moir, D.T. 1985. Heterologous protein secretion from yeast. *Science* 229, 1219-1224.
- Suzuki, K., Ichikawa, K. and Jigami, Y. 1989. Yeast mutants with enhanced ability to secrete human lysozyme: Isolation and identification of a protease-deficient mutant. *Mol. Gen. Genet.* 219, 58-64.
- Vanoni, M., Porro, D., Martegani, E. and Alberghina, L. 1989. Secretion of *Escherichia coli* β -galactosidase in *Saccharomyces cerevisiae* using the signal

sequence from the glucoamylase-encoding *STA2* gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 164, 1331-1338.

Ward, M., Wilson, L.J., Kodama, K.H., Rey, M.W. and Berka, R.M. 1990. Improved production of calf chymosin in *Aspergillus* by expression as a glucoamylase-chymosin fusion. Bio/Technology 8, 435-440.

Wilson, D.W., Wilcox, C.A., Flynn, G.C., Chen, E., Unang, W-J., Henzel, W.J., Block, M.R., Ullrich, A. and Rothman, J.E., 1989. A fusion protein required for vehicle-mediated transport in both mammalian cells and yeasts. Nature 339, 355-359.

Zagursky, R.J., Berman, M.L., Baumeister, K. and Lomax, N. 1986. Rapid and easy sequencing of large linear double stranded DNA and supercoiled plasmid DNA. Gene Anal. Techn. 2, 89-94.

Zaraoui, A., Touchot, N., Chardin, P. and Tavitian, A. 1989. The human Rab genes encode family of GTP-binding proteins related to yeast YTP1 and SEC4 products involved in secretion. J. Biol. Chem. 264, 12394-12401.

請求の範囲

1. 配列番号 1 および 3 にそれぞれ示される S S O 1 配列および S S O 2 配列、並びにそれらの相同配列から選択され、且つ真核細胞中で過剰発現させると、該細胞の分泌タンパク質産生量の増大を可能にする、s e c 1 サプレッサー遺伝子 S S O の単離された D N A 配列。
2. 該 D N A 配列が真菌由来であり、真菌宿主中で過剰発現させると、該宿主の分泌タンパク質産生量の増大を可能にする請求項 1 に記載の D N A 配列。
3. 本質的に配列番号 2 および 4 で表わされるアミノ酸配列からなる各ポリペプチドをそれぞれコードする S S O 1 配列および S S O 2 配列、並びにそれらの機能的断片から選ばれる請求項 2 に記載の D N A 配列。
4. 請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の D N A 配列を含むベクター。
5. それによって真核細胞を形質転換すると、その自律複製が可能である請求項 4 に記載のベクター。
6. それによって真核細胞を形質転換すると、その該細胞染色体への組込みが可能である請求項 4 に記載のベクター。
7. 該ベクターが酵母発現ベクターであり、該 D N A 配列が酵母遺伝子調節領域の制御下で発現されることを特徴とする請求項 4 に記載のベクター。

8. 該酵母遺伝子調節領域が、SSO1遺伝子、SSO2遺伝子、SEC1遺伝子、GAL1～GAL10遺伝子、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子ADH1、及びアスパラギンシンセターゼ遺伝子の各プロモーター領域、並びにそれらのプロモーター領域の機能的部分からなる群から選ばれることを特徴とする請求項7に記載のベクター。

9. 該ベクターが糸状菌発現ベクターであり、該DNA配列が、糸状菌類内で機能する調節領域の制御下で発現されることを特徴とする請求項4に記載のベクター。

10. 上記の糸状菌類内で機能する調節領域が、*ss o*、*c b h 1*、*c b h 2*、*e g l 1*、*e g l 2*、*t e f 1*、*p g k*、*p k i*、グルコアミラーゼ、 α -アミラーゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼの遺伝子の各プロモーター領域からなる群から選ばれることを特徴とする請求項9に記載のベクター。

11. 構造がそれぞれ図1Aおよび図1Bに示されるYE pSSO1およびYE pSSO2からなる群から選ばれる真菌ベクターである請求項4に記載のベクター。

12. 請求項1～3のいずれかに記載のDNA配列を担持し、そしてSsoタンパク質を高レベルで発現する組換え真核細胞。

13. サッカロミセス(*Saccharomyces*)属、トリコデルマ(*Trichoderma*)属、クライベロミセス(*Kluyveromyces*)属、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)、ピヒア(*Pichia*)属、ハンゼヌラ(*Hansenula*)属、ヤロビア(*Yarrowia*)属、アスペルギルス(*Aspergillus*)属およびニューロスポラ(*Neurospora*)属からなる群から選ばれる種に属する真菌細胞である請求項12に記載の組換え真核細胞。

14. サッカロミセス(*Saccharomyces*)属およびトリコデルマ(*Trichoderma*)属から選ばれる種に属する真菌細胞である請求項13に記載の組換え真核細胞。

15. サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*) VTT-C-9 2072株(受託番号:DSM7253)である請求項14に記載の組換え真核細胞。

16. サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*) V T T - C - 9
2073株(受託番号: D S M 7 2 5 4)である請求項14に記載の組換え真核細胞。

17. S s oタンパク質を高レベルで発現可能な真核細胞の構築方法にして、

(a) ドナー生物から、S s oタンパク質をコードする、配列番号1および3にそれぞれ示されるS S O 1配列およびS S O 2配列、並びにそれらの相同配列から選択されるD N A配列を単離し、

(b) 該D N A配列の少なくとも1つを担持するベクターを構築し、そして

(c) 得られたベクターの少なくとも1つにより、宿主細胞を形質転換する、
ことを包含する方法。

18. 該宿主が、サッカロミセス(*Saccharomyces*)属、トリコデルマ(*Trichoderma*)属、クライベロミセス(*Kluyveromyces*)属、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)、ピヒア(*Pichia*)属、ハンゼヌラ(*Hansenula*)属、ヤロビア(*Yarrowia*)属、アスペルギルス(*Aspergillus*)属およびニューロスボラ(*Neurospora*)属からなる群から選択されることを特徴とする請求項17に記載の方法。

19. 該宿主が、サッカロミセス(*Saccharomyces*)属およびトリコデルマ(*Trichoderma*)属から選ばれる種に属することを特徴とする請求項18に記載の方法。

20. S S O遺伝子を過剰発現することにより外来性または内在性の分泌タンパク質産生量を増大させる方法にして、

(a) ドナー生物から、外来性または内在性の分泌タンパク質をコードするD N A配列を単離し、

(b) 該D N A配列の少なくとも1つを担持するベクターを構築し、

(c) 得られたベクターにより、配列番号1および3にそれぞれ示されるS S O 1配列およびS S O 2配列、並びにそれらの相同配列から選択されるD N

A配列を含み、S s oタンパク質を高レベルで発現する宿主を形質転換して組換え宿主細胞を得るか、あるいは、

該ベクターにより宿主を形質転換し、この形質転換体を配列番号1および3にそれぞれ示されるS S O 1配列およびS S O 2配列、並びにそれらの相同配列から選択されるDNA配列で再度形質転換し、上記の分泌タンパク質の産生能が高められた細胞をスクリーニングし、そして

(d) 該組換え宿主細胞を、上記の外來性または内在性の分泌タンパク質の発現が可能な条件下で培養する、
ことを包含する方法。

21. 正常量または増加された量のS s oタンパク質の存在下でS S O遺伝子と相互作用する遺伝子（例えば、S E C 1）を過剰発現することにより、外來性または内在性の分泌タンパク質の産生量を増大させる方法にして、

(a) ドナー生物から、外來性または内在性の分泌タ

ンパク質をコードするDNA配列を単離し、

(b) 該DNA配列の少なくとも1つを担持するベクターを構築し、

(c) 得られたベクターにより、S s oタンパク質を正常レベルまたは高レベルで発現し、かつS S O遺伝子と相互作用するその他の遺伝子（例えば、S E C 1）を過剰発現する宿主を形質転換して組換え宿主細胞を得るか、あるいは、

該ベクターにより宿主を形質転換し、この形質転換体をS S O遺伝子またはS S O遺伝子に相同な遺伝子、およびS S O遺伝子と相互作用する遺伝子（例えば、S E C 1）により再度形質転換し、上記の分泌タンパク質の産生能が高められた細胞をスクリーニングし、そして

(d) 得られる組換え宿主細胞を、上記の分泌タンパク質の発現が可能な条件下で培養する、
ことを包含する方法。

22. 内在性分泌タンパク質の産生を増大させる方法にして、

(a) 内在性分泌タンパク質を産生する細胞を、配列番号1および3にそ

れぞれ示されるSSO1配列およびSSO2配列、並びにそれらの相同配列から選択されるDNA配列単独で、あるいはSSO遺伝子と相互作用する遺伝子（例えば、SEC1）と共同で、形質転換し、

（b）該内在性分泌タンパク質を高レベルで産生する

形質転換体をスクリーニングし、タンパク質産生能が高められた組換え細胞を得、そして

（c）該組換え細胞を、該内在性分泌タンパク質の発現が可能な条件下で培養する、
ことを包含する方法。

23. 原料を利用して効率的にバイオマスを産生するか、または原料を効率的に加水分解する方法にして、

（a）ドナー生物から、内在性または外来性の加水分解酵素をコードするDNA配列を単離し、

（b）該DNA配列の少なくとも1つを担持する真菌ベクターを構築し、

（c）得られたベクターにより、配列番号1および3にそれぞれ示されるSSO1配列およびSSO2配列、並びにそれらの相同配列から選択されるDNA配列を包み、Ssoタンパク質を高レベルで発現する真菌宿主を形質転換して組換え宿主細胞を得るか、あるいは、

該ベクターにより宿主を形質転換し、この形質転換体を配列番号1および3にそれぞれ示されるSSO1配列およびSSO2配列、並びにそれらの相同配列から選択されるDNA配列で再度形質転換し、上記の加水分解酵素の産生能が高められた細胞をスクリーニングし、そして

（d）得られる組換え宿主細胞を、上記の加水分解酵

素の発現が可能な条件下で培養する、

ことを包含する方法。

24. 正常量または増加された量のSsoタンパク質の存在下でSSO遺伝子と相互作用する遺伝子（例えば、SEC1）を過剰発現することにより、原料を利

用して効率的にバイオマスを産生するか、または原料を効率的に加水分解する方法にして、

(a) ドナー生物から、内在性または外来性の加水分解酵素をコードするDNA配列を単離し、

(b) 該DNA配列の少なくとも1つを担持するベクターを構築し、

(c) 得られたベクターにより、正常量または増加された量のS s oタンパク質の存在下で、S s oタンパク質と相互作用するタンパク質を高レベルで発現する宿主を形質転換して組換え宿主細胞を得るか、あるいは、

該ベクターにより宿主を形質転換し、この形質転換体をS S O遺伝子またはS S O遺伝子に相同な遺伝子、およびS S O遺伝子と相互作用する遺伝子（例えば、S E C 1）により再度形質転換し、上記の加水分解酵素の産生能が高められた細胞をスクリーニングし、そして

(d) 得られる組換え宿主細胞を、上記の加水分解酵素の発現が可能な条件下で培養する、

ことを包含する方法。

【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1995年1月11日

【補正内容】

【図1A】

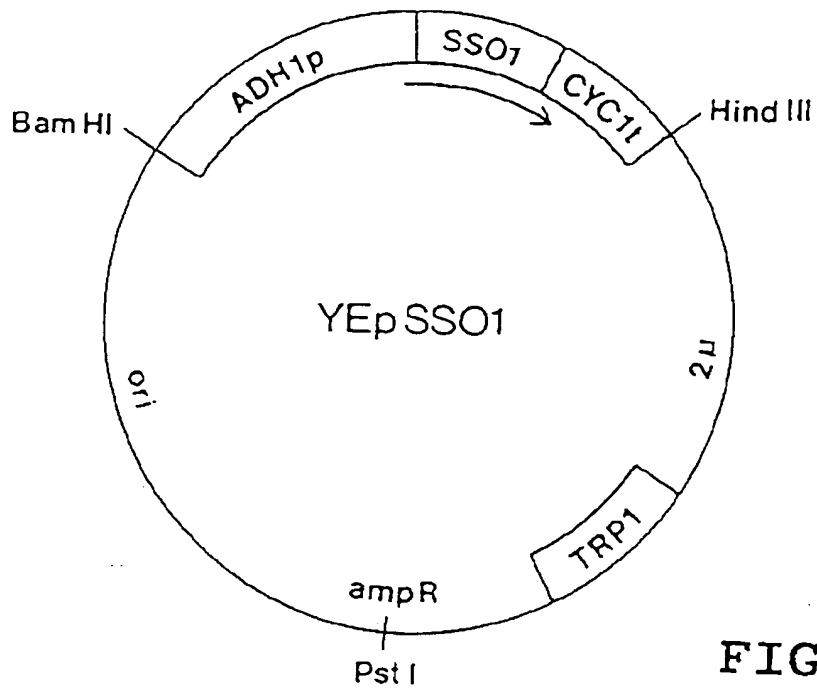


FIG. 1A

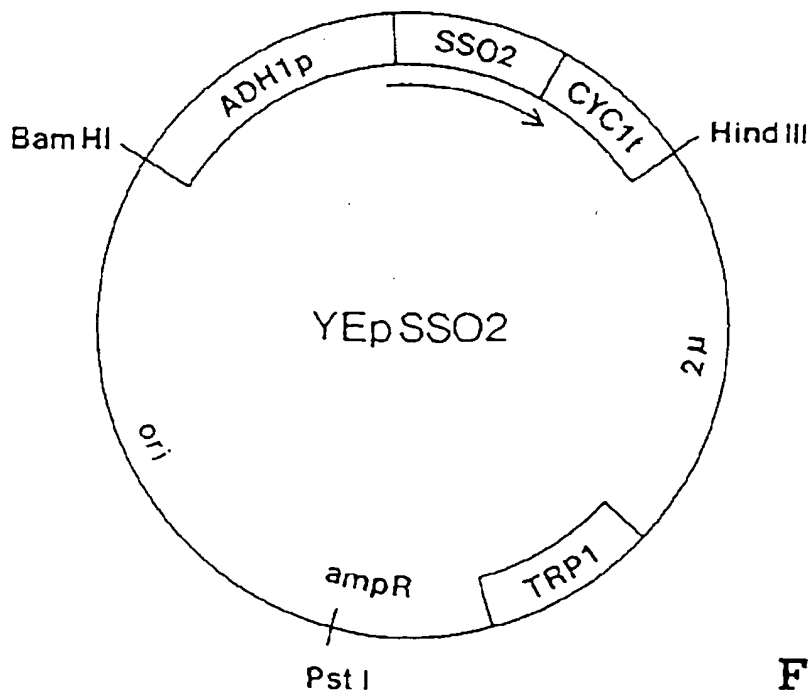
【☒ 1 B】

FIG. 1B

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI 93/00402

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC5: C12N 15/80, C12N 15/67, C12P 21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC5: C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SE,DK,FI,NO classes as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

NPI, CA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Volume 267, No 15, May 1992, Akihiro Inoue et al, "Cloning and Sequence Analysis of cDNA for a Neuronal Cell Membrane Antigen, HPC-1", pages 10613 - pages 10619 --	1-24
A	Cell, Volume 69, May 1992, Yohei Hirai et al, "Epimorphin: A Mesenchymal Protein Essential for Epithelial Morphogenesis" page 471 - page 481 --	1-24
A	EP, A1, 0284044 (ZYMOGENETICS INC.), 28 Sept 1988 (28.09.88) --	1-24

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

18 January 1994

24-01-1994

Name and mailing address of the ISA/
Swedish Patent Office
Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM
Facsimile No. +46 8 666 02 86

Authorized officer

Yvonne Siösteen
Telephone No. +46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI 93/00402

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>Appl Microbiol Biotechnol, Volume 37, 1992, E. Martegani et al, "Expression of high levels of human tissue plasminogen activator in yeast under the control of an inducible GAL promoter" page 604 - page 608</p> <p style="text-align: center;">-- -----</p>	1-24

Information on patent family members

International application No.

PCT/FI 93/00402

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A1- 0284044	28/09/88	CA-A- 1304020	23/06/92
		JP-A- 1016587	20/01/89

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁶ 識別記号 庁内整理番号 F I

//(C 1 2 N 15/09

 C 1 2 R 1:865)

(C 1 2 N 1/19

 C 1 2 R 1:66)

(C 1 2 N 1/19

 C 1 2 R 1:865)

(C 1 2 N 1/19

 C 1 2 R 1:885)

(C 1 2 N 1/19

 C 1 2 R 1:84)

(C 1 2 N 1/19

 C 1 2 R 1:78)

C 1 2 R 1:865)

(72)発明者 オトウラ, ミカ

 フィンランド国、エフアイエヌ—00750

 ヘルシンキ、ハトゥンテキヤンクヤ 3—

 5 ビー 55

(72)発明者 ローネ, ハンス

 スエーデン国、エス—756 45 ウップサ

 ラ、ディリгентウバーゲン 169

(72)発明者 ペンッティラ, メルヤ

 フィンランド国、エフアイエヌ—00390

 ヘルシンキ、パハントウバンティエ 9

 エー 6

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record.

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.